

# *De rol van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen in Multiple Sclerose*

**Tania Pazola**

promotor :  
dr. Niels HELLINGS

co-promotor :  
Prof. dr. Pieter STINISSEN

# INHOUDSOPGAVE

---

<b>INHOUDSOPGAVE</b> .....	I
<b>VOORWOORD</b> .....	II
<b>LIJST MET AFKORTINGEN</b> .....	III
<b>LIJST MET FIGUREN</b> .....	V
<b>LIJST MET TABELLEN</b> .....	VI
<b>SAMENVATTING</b> .....	VII
<b>1 INLEIDING</b> .....	1
1.1 Multiple sclerose .....	1
1.2 Therapieën voor MS .....	4
Regulatoire mechanismen .....	5
1.2.1 Natuurlijk voorkomende suppressor cellen .....	5
1.2.2 Geïnduceerde T-cellen .....	7
1.3 Doel van de stage .....	10
<b>2 MATERIAAL EN METHODEN</b> .....	11
2.1 Gezonde controles .....	11
2.2 Gebruikte celsuspensies, media en stimuli/antigenen .....	11
2.3 Genereren van MBP-reactieve klonen .....	11
2.4 Fenotypering van MBP-reactieve T-celklonen met behulp van <i>fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS) kleuring .....	12
2.5 Isolatie van CD4 <sup>+</sup> en CD8 <sup>+</sup> T-cellen .....	13
2.5.1 Isolatie van CD4 <sup>+</sup> T-cellen met behulp van RosetteSep .....	13
2.5.2 Isolatie van CD4 <sup>+</sup> en CD8 <sup>+</sup> T-cellen met behulp van <i>Magnetic         Activated Cell Sorting</i> (MACS) .....	13
2.6 Lange termijn co-cultuur .....	14
2.7 Korte termijn co-cultuur .....	16
2.8 Studie van de invloed van cytokines op de HLA-E expressie .....	17
<b>3 RESULTATEN</b> .....	18
3.1 MBP-reactieve T-celklonen .....	18
3.1.1 Genereren van MBP-reactieve T-celklonen .....	18
3.1.2 Fenotypering van MBP-reactieve T-celklonen met behulp van <i>fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS) .....	20
3.2 Co-cultuur van CD8 <sup>+</sup> T-cellen en stimulatorcellen .....	23
3.2.1 Limiting dilution assay .....	23
3.2.2 CFSE assay .....	25
3.3 Invloed van cytokines op de HLA-E expressie .....	27
<b>4 DISCUSSIE</b> .....	31
<b>REFERENTIES</b> .....	37

## VOORWOORD

---

Het is zover, met mijn stage en deze thesis wordt mijn studentenperiode afgesloten. Ik wil dan ook even stilstaan om verscheidene mensen te bedanken voor de steun, begeleiding, raad en nog zoveel meer dat ze me gegeven hebben.

In eerste instantie wil ik mijn stagebegeleidster Kim Pannemans bedanken voor haar begeleiding en raad die ze me gegeven heeft tijdens mijn stageperiode en bij het schrijven van mijn thesis.

Een tweede dankbetuiging gaat naar mijn promotor Dr. Niels Hellings. Mijn thesis werd onderworpen aan zijn kritische ogen en hij me veel raad gegeven bij het schrijven van mijn thesis. Ook wil ik mijn co-promotor Prof. Dr. Piet Stinissen en mijn tweede beoordelaar Prof. Dr. Leen De Ryck bedanken voor de tijd die ze vrij gemaakt hebben om mijn thesis te evalueren.

Ook een gemeente dankjewel aan de andere stagairs Tina, Bieke, Marianne, Nick en Pieter voor de fijne sfeer op Biomed.

En natuurlijk nog een dankvermelding voor alle vrijwillige bloeddonoren. Zonder hun had ik mijn onderzoeksstage niet kunnen verwezelijken.

Ten slotte wil ik het thuisfront bedanken. Dank je wel mama en papa voor al de steun die jullie me al die jaren gegeven hebben. Maar ook vooral dat jullie me de kans hebben gegeven om mijn studies waar te maken. En ook een speciale gedachte gaat uit naar mijn neef Walter. Door hem is mijn interesse gegroeid in de biomedische wereld. Hij heeft me dan ook doorheen de jaren enorm veel bemoedigende schouderklopjes en steun gegeven. Helaas is hij overleden en is hij er niet bij wanneer ik deze mijlpaal in mijn leven bereik...

## LIJST MET AFKORTINGEN (1)

---

AM	Autoloog medium
APC	Antigen presenterende cellen
$\beta$ 2m	$\beta$ 2-microglobine
BHB	Bloed-hersen-barriere
CFSE	<i>5,6-carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CMV	Cytomegalovirus
Cpm	<i>Counts per minutes</i>
CTL	Cytotoxische T-lymfocyten
CTLA-4	Cytotoxisch T-lymphocyt antigen 4
CZS	Centraal zenuwstelsel
DC	Dendritische cellen
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Foetaal kalf serum
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>Forkhead/winged helix family, de forkhead box protein 3</i>
GA	Glatirameer-acetaat
HC	<i>Healthy control</i>
HLA-E	<i>Human leukocyte antigen E</i>
HSP60	<i>Heat shock protein 60</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- $\beta$	Interferon- $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukine
ILT3	<i>Ig-like transcript 3</i>
KM	Kweekmedium
LDA	<i>Limiting dilution assay</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAG	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix metalloproteinase
MOG	<i>Oligodendrocyte glycoproteins</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
MS	Multiple sclerose

## LIJST MET AFKORTINGEN (2)

---

NK cellen	<i>Natural killer cellen</i>
NK T-cellen	<i>Natural killer T-cellen</i>
PBMC	Perifere bloed mononucleaire cellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	<i>Phycoerythrine</i>
PercP	<i>Peridin chlorophyll protein</i>
PHA	<i>Phytohaemagglutine</i>
PLP	<i>Proteolipid protein</i>
PP-MS	<i>Primary progressive MS</i>
QDM	<i>Qa-1 determinant modifier</i>
RR-MS	<i>Relapsing remitting MS</i>
SI	Stimulatie index
SP-MS	<i>Secondary progressive MS</i>
TCR	T-cel receptor
TCV	T-celvaccinatie
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TH	T-helper
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg	Regulatoire T-cellen

## LIJST MET FIGUREN

---

- Figuur 1:** Huidige hypothese over de pathogenese van de multiple sclerose.
- Figuur 2:** De regulatoire CD8<sup>+</sup> T-cel pathway.
- Figuur 3:** Co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen en stimulator cellen.
- Figuur 4:** CFSE-assay van CD8<sup>+</sup> T-cellen en rustende of geactiveerde bestraalde autologe CD4<sup>+</sup> T-cellen zonder of met blokken van HLA-E.
- Figuur 5:** De activatiestatus van de MBP-reactieve T-celklonen.
- Figuur 6:** HLA-E oppervlakte-expressie van de MBP-reactieve T-celklonen.
- Figuur 7:** Correlatie tussen CD25-expressie en HLA-E oppervlakte expressie op het oppervlak van MBP-reactieve T-celklonen.
- Figuur 8:** Reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen.
- Figuur 9:** Reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen.
- Figuur 10:** Percentage prolifererende CD8<sup>+</sup> T-cellen in co-cultuur met stimulatorcellen.
- Figuur 11:** Invloed van pro-inflammatoire en regulatoire cytokines op de HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC en K-562 cellen getransfecteerd met HLA-E.
- Figuur 12:** Effect van een hoge concentratie van pro-inflammatoire en regulatoire cytokines op de HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC.
- Figuur 13:** Invloed van de cytokines op het verhogend effect van anti-CD3 op de HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC.

## LIJST MET TABELLEN

---

- Tabel 1:** Kenmerken van regulatoire T-cel (Treg) subsets.
- Tabel 2:** Overzicht van stimulatie indexen (SI) van de positieve lijnen en daaruit afgeleide MBP-reactieve T-celklonen.
- Tabel 3:** Percentage CD4<sup>+</sup> T-cellen binnen MBP-reactieve T-celklonen.
- Tabel 4:** Percentage MBP-reactieve T-celklonen met een TCRαβ gebruik.

## SAMENVATTING

---

Multiple sclerose (MS) is een chronische inflammatoire aandoening van het centraal zenuwstelsel waarbij autoreactieve T-cellen vermoedelijk een belangrijke rol spelen. Deze autoreactieve T-cellen zijn echter ook aanwezig bij gezonde individuen zonder dat dit aanleiding geeft tot de ontwikkeling van auto-immuniteit. Er bestaan verschillende mechanismen om deze autoreactieve T-cellen te reguleren waaronder regulatoire T-cellen. Diermodelstudies hebben aangetoond dat naast de natuurlijk voorkomende regulatoire T-cellen ook een bepaald subtype van CD8<sup>+</sup> T-cellen hierbij een belangrijke rol speelt. Deze CD8<sup>+</sup> T-cellen herkennen een antigen gepresenteerd door een Qa-1-molecule, een niet klassiek MHC-Ib molecule, op de autoreactieve T-cel waardoor deze laatste onderdrukt wordt. Gegevens omtrent de humane variant, HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen, zijn echter beperkt. Het doel van deze stageperiode is de studie van de rol van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen in MS.

Een eerste stap in de stageperiode was de generatie van MBP-reactieve T-celklonen. Deze werden vervolgens gefenotypeerd. Bijna alle geanalyseerde MBP-reactieve T-celklonen vertonen een CD4<sup>+</sup> fenotype en TCRαβ-fenotype. Alle geanalyseerde MBP-reactieve T-celklonen brachten CD25 en HLA-E tot expressie, hoewel dit binnen de verschillende klonen varieerde. Bovendien is er een positieve correlatie tussen de HLA-E expressie en de CD25-expressie. Deze MBP-reactieve T-celklonen werden vervolgens gebruikt als stimulatorcellen in een co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen. Via een *limiting dilution* assay kon afgeleid worden dat CD8<sup>+</sup> T-cellen een significant hogere reactiviteit vertonen ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen dan ten opzichte van PBMC. Deze reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen zullen in de toekomst verder gekloneerd worden voor de generatie van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen. Om de rol van activatie na te gaan bij de generatie van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen, werden CD8<sup>+</sup> T-cellen in co-cultuur gebracht met op voorhand geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen. Er werd opnieuw reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen gedetecteerd die significant hoger was dan de reactiviteit ten opzichte van rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen. Verder onderzoek moet eveneens uitwijzen of de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van de geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen HLA-E gerestricteerd is.

Naast de LDA werd de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen geanalyseerd op een kortere termijn via een CFSE assay. Ook hier werd reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen waargenomen. Wanneer de geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen op voorhand geblokt werden met een antilichaam tegen HLA-E werd een geringe daling in het percentage reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen waargenomen. De CFSE assay dient echter verder geoptimaliseerd te worden.

Aangezien multiple sclerose een chronische ontstekingsziekte is, werd het effect van een inflammatoire omgeving op de HLA-E oppervlakte-expressie bestudeerd. Een lage concentratie van de pro-inflammatoire cytokines IFN-γ en TNF-α deden de HLA-E oppervlakte-expressie in geringe mate toenemen, een hoge concentratie daarentegen verminderde de HLA-E oppervlakte-expressie. Het regulatoire cytokine IL-10 daarentegen bleek geen effect te hebben op de HLA-E expressie.

Verdere studies omtrent HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen zal meer inzicht brengen in de regulatie van auto-immune responsen en in de pathogenese van MS. Op termijn kan dit aanleiding geven tot de ontwikkeling van nieuwe en meer specifieke therapieën voor MS.



# 1 INLEIDING

---

## 1.1 Multiple sclerose

Multiple Sclerose (MS) wordt beschouwd als een chronische inflammatoire aandoening van het centraal zenuwstelsel (CZS), die vermoedelijk gemedieerd wordt door auto-immune processen [1]. Aangezien de ziekte verscheidene delen van het zenuwstelsel aantast, vertoont MS onvoorspelbare symptomen die variëren van persoon tot persoon en die veranderen in de verdere evolutie van de ziekte [2, 3]. De meest voorkomende symptomen zijn visuele en sensorische verstoringen, vermoeidheid, cognitieve dysfuncties en het verlies van elasticiteit in de spieren wat gepaard gaat met spierzwakte [2].

De incidentie van MS bedraagt 2,5 miljoen mensen wereldwijd, met de hoogste prevalentie in Europa en Noord Amerika [4, 5]. De ziekte ontwikkelt zich in jong volwassenen en wordt doorgaans gediagnostiseerd tussen de leeftijd van 20 en 40 jaar [4].

Er bestaat echter nog geen laboratorium-gebaseerde diagnostische test voor MS. De diagnose wordt gebaseerd op klinisch onderzoek, *magnetic resonance imaging* (MRI) en laboratoriumtesten zoals de analyse van het cerebrospinaal vocht [5].

Er bestaan drie klinische vormen van MS, namelijk *relapsing remitting MS* (RR-MS), *primary progressive MS* (PP-MS) en *secondary progressive MS* (SP-MS). De RR-vorm van MS wordt gekarakteriseerd door een reeks aanvallen die resulteren in verschillende graden van deficiënties (*relapse*), afgewisseld door gedeeltelijke of volledige herstelling (remissie). In 30 tot 40 procent van de gevallen ontbreken deze acute aanvallen en evolueert de ziekte tot SP-MS met persistente verslechtering van het ziekteproces zonder herstelperiodes [5, 6]. Een kleine fractie van de MS-patiënten ontwikkelen onmiddellijk de PP-vorm van de ziekte. Deze vorm kent enkele exacerbaties maar geen remissieperiodes. Deze patiënten ondergaan een graduele klinische verslechtering [4].

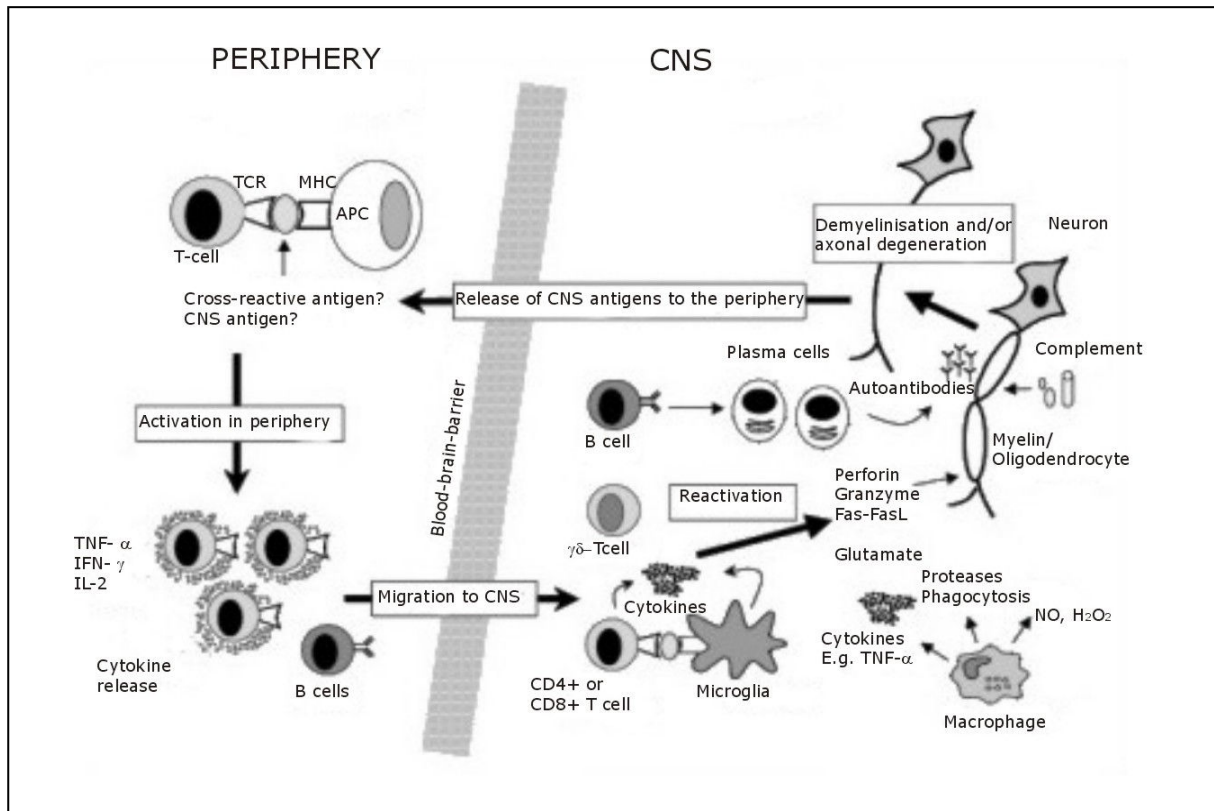
De etiologie van MS blijft grotendeels ongekend. De meest gangbare hypothese is dat MS een auto-immune ziekte is die beïnvloed wordt door zowel genetische als exogene factoren. Uit familie- en tweelingenstudies blijkt dat de gevoeligheid voor MS overgeërfd kan worden. Bijkomende studies werden uitgevoerd om te bepalen welke genen betrokken zijn in de ontwikkeling van de ziekte. Deze onderzoeken waren voornamelijk gericht op genen die coderen voor de elementen van het trimoleculair systeem (*major histocompatibility complex* (MHC) – antigen – T-cel receptor (TCR)) die betrokken zijn bij T-cel activatie. Genetische linkage studies van het HLA-allel toont een sterke associatie tussen het HLA-DR2 gen en MS [7]. TCR  $\alpha$  en  $\beta$  genen werden ook onderzocht als mogelijk betrokken genen. Enkele studies toonden aan dat er een verband bestaat tussen MS-ontwikkeling en de genen die coderen voor de TCR, maar andere studies zijn

er niet in geslaagd om dit te bevestigen [8, 9]. Een derde gen dat bestudeerd is, is het *myelin basic protein* (MBP)-gen. Een genetische associatie tussen MS en MBP-polymorfismen is aangetoond in enkele studies, andere studies daarentegen konden deze resultaten niet ondersteunen [10, 11]. Uit recentere onderzoeken blijkt dat genen die coderen voor MBP, *proteolipid protein* (PLP) en *myelin associated glycoprotein* (MAG) geen significant genetisch effect vertonen voor de gevoeligheid voor MS. Deze studies hebben echter niet kunnen uitsluiten dat *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) genen een mogelijke rol heeft. Andere kandidaatgenen waarnaar onderzoek gebeurt, zijn onder andere genen die coderen voor cytokines en cytokine receptoren, voor adhesiemoleculen, immunoglobulines en apoptosegenen [5].

Genetische predispositie is echter niet voldoende om de ziekte te ontwikkelen. Naast genetische factoren spelen ook omgevings- en immunologische factoren een belangrijke rol [12].

De hypothese voor de pathogenese van MS ligt vermoedelijk bij het immuunsysteem van de patiënt. De ziekte wordt gemedieerd door auto-immune processen gericht tegen oligodendrocyten en hun myelineschede in het CZS wat leidt tot axonale schade [5, 13].

De initiële gebeurtenis in de pathogenese van MS is de activatie van myeline reactieve T-cellen in de periferie. Deze geactiveerde T-cellen brengen vervolgens adhesiemoleculen tot expressie en secreteren pro-inflammatoire cytokines wat migratie doorheen de bloed-hersen-barrière (BHB) naar het CZS mogelijk maakt. In het CZS worden de myeline reactieve T-cellen geheractiveerd wanneer ze in contact komen met hun specifieke myeline epitoom dat gepresenteerd wordt door antigen presenterende cellen (APC), zoals microgliacellen of perivasculaire macrofagen. Na heractivatie produceren deze T-cellen pro-inflammatoire cytokines, zoals *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ) en *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ), wat leidt tot de opregulatie van enerzijds MHC klasse II moleculen op astrocyten en microgliacellen en anderzijds adhesiemoleculen op de BHB-endotheel. Dit vergemakkelijkt de verdere infiltratie van T-cellen, B-cellen en macrofagen en draagt dus bij aan de amplificatie van de inflammatoire respons van het immuunsysteem. Het gecombineerd effect van cytotoxische cellen, zuurstof radicalen, demyeliniserende auto-antilichamen en cytokines die toxiciteit induceren leidt tot de afbraak van myeline. In latere stadia worden de oligodendrocyten eveneens beschadigd wat leidt tot axon verlies. Dit heeft een verminderde geleidbaarheid tot gevolg en is dus de hoofdoorzaak van de neurologische defecten [5, 13] (figuur 1).



**Figuur 1: Huidige hypothese over de pathogenese van de multiple sclerose [5]**

Myeline reactieve T-cellen worden geactiveerd in de periferie. Deze cellen migreren vervolgens doorheen de BHB met behulp van hun adhesiemoleculen en pro-inflammatoire cytokines. In het CZS worden deze cellen geheractiveerd en secreteren ze pro-inflammatoire cytokines. Dit leidt tot de opregulatie van MHC klasse II- en adhesiemoleculen wat T-cel, B-cel en macrofaag infiltratie vergemakelijkt. Als gevolg hiervan wordt myeline en oligodendrocyten afgebroken wat uiteindelijk zal leiden tot axonschade.

TCR: T-cel receptor, APC: antigeen presenterende cel, MHC: major histocompatibility complex, CNS: centraal zenuwstelsel, TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukine, IFN: interferon.

Pathologisch wordt MS gekarakteriseerd door meerdere sclerotische lesies wat het resultaat is van myelineverlies. Deze lesies zijn verspreid in de witte materie van het volledige CZS, maar zijn voornamelijk in de periventriculaire gebieden, de optische zenuwen, hersenstam en ruggenmerg gelokaliseerd [5].

De opvatting dat MS een autoimmuune aandoening is, vindt zijn basis in diermodelstudies. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), een diermodel voor MS, heeft inzichten opgeleverd in de auto-immuune en basale immunologische mechanismen. Deze experimentele ontstekingsziekte wordt gekarakteriseerd door focale demyelinisatie en T-cel infiltratie in het CZS en deelt veel klinische en histologische kenmerken met MS. EAE kan geïnduceerd worden bij dieren door injectie van immunodominante peptides van myeline proteïnen zoals MBP, PLP en MOG, of door transfer van CD4<sup>+</sup> MHC klasse-II gerestricteerde T-cellen die reactief zijn met deze peptides. Het EAE-model heeft echter enkele beperkingen doordat er verschillen zijn tussen EAE en MS. Een eerste verschil is

dat MS een spontane ziekte is, terwijl EAE geïnduceerd wordt. Verder is het onwaarschijnlijk dat de gebruikte immuunadjuvanten om EAE te induceren een gelijkaardige immunologische effect hebben als deze onder fysiologische omstandigheden. Ten slotte wordt EAE bestudeerd bij inteelt dieren of in genetisch homologe populaties waardoor genetische heterogeniteit niet in rekening wordt gebracht [14]. Ondanks deze beperkingen heeft EAE al veel inzicht verworven in de pathogenese van MS en is het een nuttig model voor het bestuderen van veel aspecten van de mogelijke autoimmune responsen bij MS. Verder speelt dit diermodel een belangrijke rol in het testen van mogelijke therapieën voor MS [5,6].

## **1.2 Therapieën voor MS**

Tot nu toe bestaat er nog geen therapie die het ziekteproces van MS kan tegen gaan. Behandelingen zijn er enkel op gericht om de symptomen te bestrijden en om exacerbaties af te remmen. Voorbeelden van zo een behandeling zijn immunomodulerende geneesmiddelen zoals interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) en glatirameer-acetaat (GA) [15].

IFN- $\beta$  reduceert T-cel activatie, beïnvloedt BHB-lekkage door matrix metalloproteinase (MMP) te inhiberen, stabiliseert BHB permeabiliteit, moduleert de expressie van adhesiemoleculen, reguleert lymfocyt apoptose en induceert een Th2-immuun deviatie. Verder versterkt IFN- $\beta$  therapie het effect van regulatoire T-cellen [16].

GA is een synthetische copolymeer van vier verschillende aminozuren die gelijkenissen vertonen met myeline afbraakproducten. Een mogelijk werkingsmechanisme is onderdrukking van de myelineafbraak door competitie tussen GA en myelinepeptiden voor de bindingsplaats op MHC klasse-II moleculen [5, 15].

Vermits de beschikbare therapieën slechts gedeeltelijk effectief zijn, is men overgeschakeld naar meer specifieke doelwitten voor de behandeling. Een voorbeeld van dergelijke experimentele behandelingen is T-celvaccinatie (TCV) [17]. Hierbij worden patiënten geïnjecteerd met autoloog bestraalde auto-antigen reactieve CD4<sup>+</sup> T-cellen [15]. Initiële experimenten bij ratten toonden aan dat door TCV het dier beschermd werd tegen inductie van EAE en dat remissie van de ziekte geïnduceerd kan worden [18]. TCV induceert regulatoire netwerken die door activatie van T-cellen, de gevaccineerde T-cellen specifiek onderdrukken [17, 18].

### **1.3 Regulatorische mechanismen**

Om immuunresponsen te reguleren en auto-immuniteit te onderdrukken heeft het immuunsysteem verscheidene mechanismen ontwikkeld om de expansie en differentiatie van autoreactieve CD4<sup>+</sup> T-cellen te onderdrukken en te controleren [24]. Zo worden ontwikkelende T-cellen die sterk reageren met zelf-peptiden geëlimineerd in de thymus door negatieve selectie [25]. Veel zelf-reactieve T-cellen met een lage tot intermediaire affiniteit voor een zelf-antigen ontsnappen echter aan deze negatieve selectie en worden vrijgelaten in de periferie waar ze geactiveerd worden, prolifereren en differentiëren tot pathogene effectorcellen [21]. Bijgevolg zijn er naast de negatieve selectie ook nog andere regulatorische mechanismen nodig. Enerzijds bestaan er homeostatische mechanismen, intrinsiek aan de activatie en differentiatie van antigen-gestimuleerde immunocompetente cellen en anderzijds zijn er extrinsieke mechanismen die gemedieerd worden door suppressorcellen [21].

Een eerste niveau van intrinsieke controle wordt gemedieerd tijdens de initiële interactie van de CD4<sup>+</sup> T-cellen met MHC/peptide complexen op het oppervlak van APC. Dit mechanisme bepaalt of er T-cel activatie, anergie of apoptose zal optreden. Een tweede intrinsieke controle gebeurt via costimulatorische ligand interacties tussen de twee celtypes. Wanneer deze interacties niet adequaat genoeg zijn, leidt dit tot anergie of tolerantie van de CD4<sup>+</sup> T-cellen. Een derde mechanisme, dat gemedieerd wordt door cytokines, reguleert de groei en differentiatie van geactiveerde T-cellen. Deze cytokines bepalen de differentiatie van de naïeve T-helper (TH) precursorcel in een IFN- $\gamma$  producerende TH1 cel of in een IL-4 en IL-10 producerende TH2 cel [19, 21].

Naast de intrinsieke mechanismen van homeostatische regulatie zijn er extrinsieke mechanismen die gemedieerd worden door regulatorische T-cellen die de inductie en uitgroei van antigen geactiveerde T-cellen onder controle houdt. Deze regulatorische T-cellen kunnen onderverdeeld worden in 2 groepen; de natuurlijk voorkomende en de geïnduceerde regulatorische T-cellen [21] (tabel 1).

#### 1.3.1 Natuurlijk voorkomende suppressor T-cellen

Tot de natuurlijk voorkomende regulatorische T-cellen (Treg) behoren de *natural killer* T-cellen (NK T-cellen) alsook de CD4<sup>+</sup> regulatorische T-cellen.

NK T-cellen zijn een unieke populatie van cellen die zowel NK-receptoren als de TCR $\alpha\beta$  tot expressie brengen. Ze worden geactiveerd door glycolipide antigenen die gepresenteerd worden door het MHC klasse I molecule CD1d. Na TCR stimulatie secreteren de NK T-cellen grote hoeveelheden cytokines, zoals IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 en TNF- $\alpha$ . Deze cytokines zijn betrokken in de activatie van celtypes die belangrijk zijn in het mediëren van zowel het aangeboren immuuniteit als Th2-type verworven immuuniteit. NK

T-cellen beïnvloeden dus de Th1/Th2 balans in immuunreacties tegen onder andere zelfantigenen beïnvloeden [22].

**Tabel 1:** Kenmerken van regulatoire T-cel (Treg) subsets [21]

Treg subsets	Doelwitcellen	Moleculaire interactie tussen regulatoire cellen en inducerende/doelwitcellen		Beïnvloede immuniteitfase	Regulatoire mechanismen	In vivo functie
		Inductie fase	Effector fase			
NKT cellen	Tumorcellen, pathogeen geactiveerde T-cellen en/of APC	Herkenning van CD1d/glycolipide door TCR; Gerestricteerd door CD1d	Hetzelfde als inductie fase	Natuurlijk; aangeboren	IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ; cytotoxiciteit	Destructie van tumoren en pathogenen; Regulatie van Th1-gemedieerde auto-immune ziekten
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> Tregs	T- en B-cellen; ?APC	Niet-specifieke activatie door MHC klasse II-peptiden	Kan functioneren via complexe cytokines	Primair vroeg	Hoofdzakelijk gemedieerd door cytokines	Suppressie van een variëteit aan auto-immune ziekten
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs	T-cellen; ?APC	Niet-specifieke activatie door MHC klasse II-peptiden	Doelwit en specificiteit zijn ongekend; Suppressie is niet MHC-gerestricteerd	Primair vroeg	Vereist cel-cel contact; Cytokines	Preventie van een variëteit aan auto-immune ziektes, regulatie van allograft afstoting; Immun respons tegen pathogenen
Qa-1 – gerestricteerde CD8 <sup>+</sup> Tregs	Antigen-geactiveerde T-cellen die differentieel Qa-1 – zelf-peptiden tot expressie brengen	Herkenning van Qa-1/hydrofobisch zelf-peptiden door TCR; Gerestricteerd door Qa-1	Hetzelfde als inductiefase	Secundair laat	Cytotoxiciteit; Vereist cel-cel contact, ?Cytokines	Afstellen van perifere TCR repertoire; Behouden van zelf-tolerantie en het controlleren van het auto-immune ziekten
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> Tregs	DC	Geactiveerd door klassieke MHC klasse Ia-peptide, Niet-specifiek?	Doelwit van suppressie is ongekend	Primair vroeg	Opregulatie van ILT3 en ILT4 op DC	Mogelijke regulatie van auto-immuniteit

Een tweede groep van natuurlijk voorkomende suppressor cellen zijn de CD4<sup>+</sup> T regulatoire cellen. Deze cellen bedragen 5-10% van de perifere CD4<sup>+</sup> T-cel populatie [23, 24]. De natuurlijk voorkomende Tregs worden gefenotypeerd door de expressie van enkele oppervlaktemerker, zoals de IL-2R $\alpha$  receptormolecule (CD25). Deze merker is echter niet specifiek voor deze regulatoire cellen. Een merker die wel specifiek is voor de CD4<sup>+</sup> regulatoire T-cellen is de transcriptie factor die behoort tot de *forkhead/winged helix family*, de *forkhead box protein 3* (FoxP3) [23, 25]. FoxP3 is waarschijnlijk het meest kritische molecule in zowel het ontstaan als de functie van de natuurlijke Tregs. Verminderde FoxP3-niveaus indiceert een verstoring in de immuunregulatie door Tregs en draagt dus bij aan het ziekteproces [26]. De belangrijkste eigenschap van deze regulatoire cellen is hun mogelijkheid om immuunresponsen te onderdrukken. Ze zijn in staat om verscheidene cellen die betrokken zijn in zowel het aangeboren als het verworven immuunsysteem te inhiberen. Deze Tregs hebben TCR-stimulering en IL-2 nodig om hun suppressieve effecten uit te voeren [23, 25]. Naast dit cel-cel contact kunnen de Tregs ook functioneren door de secretie van verscheidene cytokines. Zo

oefenen de Tregs een sterke suppressie uit op Th1-cellen door de secretie van Th2 cytokines zoals IL-4 en geven ze op deze manier bescherming tegen auto-immune aandoeningen [25].

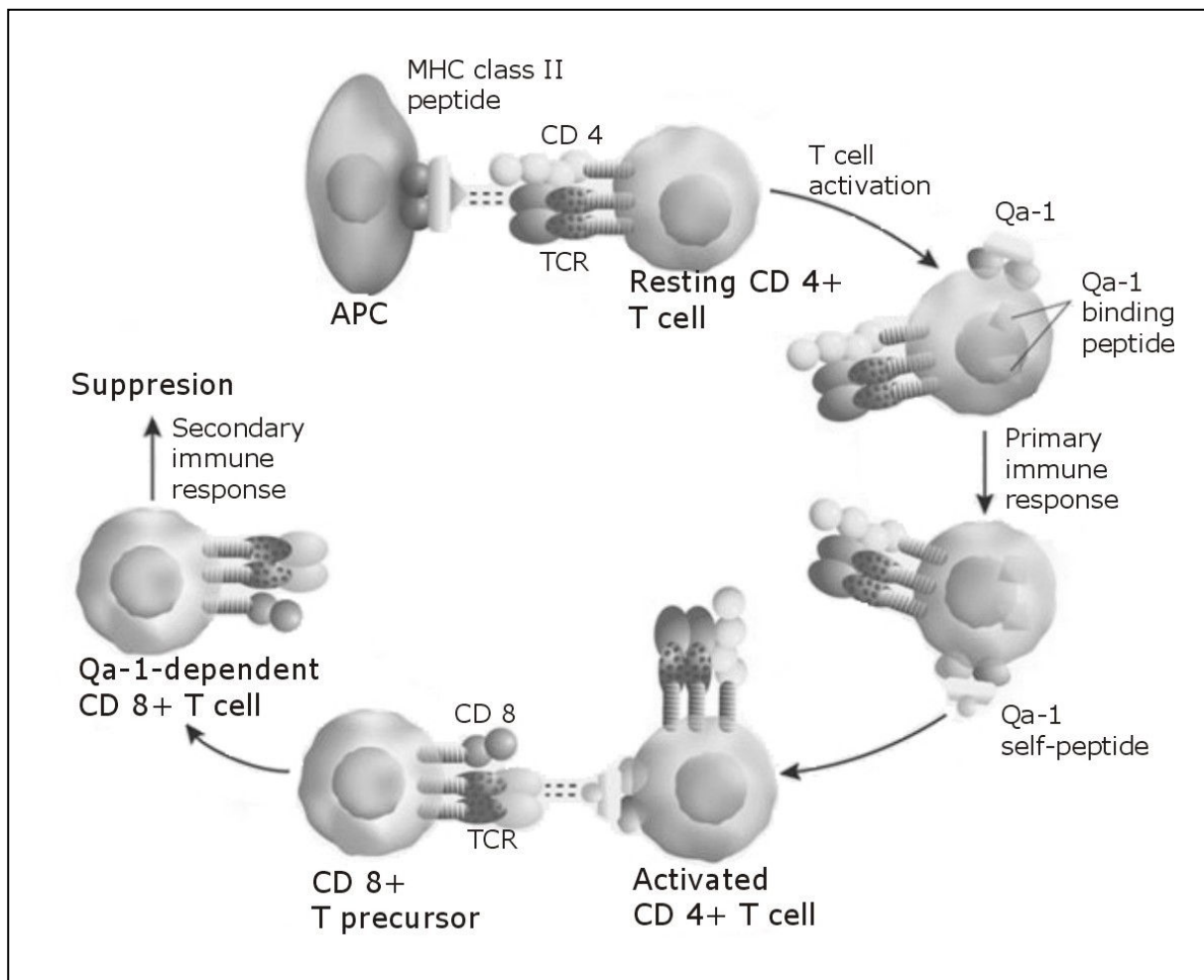
### 1.3.2 Geïnduceerde Treg-cellen

Een laatste subgroep van T-cellen zijn de geïnduceerde T-cellen. Deze cellen worden gegenereerd van mature T-cel populaties onder bepaalde condities van blootstelling aan antigenen en/of costimulatie [25, 30]. Ten eerste zijn er de anti-idiotypen en anti-ergotype T-cellen. Anti-idiotypen T-cellen herkennen idiotypen determinanten in het variabel of hypervariabel gedeelte (CDR2 en CDR3) van de TCR. Peptiden van celoppervlakte moleculen worden vaak gepresenteerd door MHC klasse I moleculen, wat leidt tot de activatie van CD8<sup>+</sup> anti-idiotypen T-cellen [27]. Anti-ergotype T-cellen reageren daarentegen op activatiemerken (ergotopen) die voorkomen op geactiveerde T-cellen. Ze kunnen zowel CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> T-cellen zijn er kunnen zowel een TCRαβ als een TCRγδ fenotype vertonen. De interactie tussen anti-ergotype T-cellen en stimulator T-cellen vereist cel-cel contact tussen de T-cellen [28, 29].

Een tweede populatie cellen die tot de geïnduceerde T-cellen behoren zijn de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cellen. Deze cellen zijn antigeen-specifiek en onderdrukken immuunresponsen door rechtstreeks te interageren met antigeen presenterende dendritische cellen (DC) waardoor deze toleroog worden. De suppressie gebeurt door opregulatie van inhibitorische *Ig-like transcript 3* (ILT3) en ILT4 receptoren die voorkomen op DCs [31].

Uit diermodelstudies blijkt dat er nog een derde groep van geïnduceerde suppressor T-cellen bestaan, namelijk de Qa-1 gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen. In tegenstelling tot de natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs worden Qa-1 gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen specifiek geïnduceerd tijdens de primaire adaptieve immuunrespons waarna ze differentiëren tot effectorcellen en CD4<sup>+</sup> T-cellen die het Qa-1/zelf-peptide complex tot expressie brengt, onderdrukken [32, 34, 35] (figuur 2). Qa-1 is een niet-klassiek MHC klasse Ib-molecule dat vooral tot expressie komt op geactiveerde T-cellen. Qa-1 heeft een beperkt polymorfisme en kan zowel zelf- als vreemde peptiden presenteren aan CD8<sup>+</sup> T-cellen [32, 33]. Murine MHC klasse-Ib moleculen Qa-1 en het humane homoloog, *human leukocyte antigen E* (HLA-E), vormen een heterodimeer met β2-microglobuline (β2m) in lymfoïde cellen. Peptide-bevattende Qa-1 complexen kunnen met twee klasse receptoren binden. Enerzijds zijn er Qa-1 heterodimeren die peptiden afgeleid van de MHC klasse Ia sequentie binden, namelijk *Qa-1 determinant modifier* (QDM). Dit complex van Qa-1 en zijn antigeen bindt aan de CD94/NKG2A receptor op NK-cellen en op een subpopulatie van CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-lymfocyten (CTL) waardoor hun activiteit geïnhibeerd wordt. Anderzijds vertoont Qa-1 een hoge affiniteit voor peptiden afgeleid van TCR Vβ, cytomegalovirus (CMV), influenzavirus, of van *heat shock protein 60* (HSP60). Deze

interactie tussen deze Qa-1/ligand complexen en de TCR op CD8<sup>+</sup> T-cellen kan leiden tot activatie, proliferatie en expressie van de effectorfunctie van de CD8<sup>+</sup> T-cellen [32, 34].



**Figuur 2: De regulatoire CD8<sup>+</sup> T-cel pathway [35]**

De CD8<sup>+</sup> T-cel regulatoire pathway wordt geïnitieerd door de activatie van naieve CD4<sup>+</sup> T-cellen tijdens de primaire immuun respons, waarin de TCR op CD4<sup>+</sup> T-cellen interageren met MHC klasse II-peptide complexen die gepresenteerd worden door conventionele APC. Deze initiële interactie induceert Qa-1-zelf-peptide complexen om tot expressie te komen op bepaalde CD4<sup>+</sup> T-cellen. Het Qa-1-zelf-peptide complex dat tot expressie gebracht wordt door geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen prikkelt de αβ TCR op geactiveerde CD8<sup>+</sup> T-cellen. Deze CD8<sup>+</sup> T-cellen differentiëren dan tot effectorcellen, die op hun beurt CD4<sup>+</sup> T-cellen, die Qa-1-zelf-peptide complex tot expressie brengen, onderdrukken.

Diermodelstudies hebben aangetoond dat CD4<sup>+</sup> T-cellen Qa-1-TCR Vβ motieven tot expressie brengen en op deze manier herkend worden door precursor CD8<sup>+</sup> T-cellen. Deze CD8<sup>+</sup> T-cellen interageren via hun TCR αβ met de CD4<sup>+</sup> T-cellen en worden op deze wijze geïnduceerd tot differentiatie, wat leidt tot de onderdrukking van alle CD4<sup>+</sup> T-cellen die de Qa-1-TCR Vβ motieven tot expressie brengen [19, 34]. Daarnaast hebben studies aangetoond dat muizen, waarbij EAE initiëel geïnduceerd werd door blootstelling aan



MBP, resistentie boden aan EAE wanneer de ziekte op een latere tijdstip opnieuw geïnduceerd werd.

Wanneer dit werd toegepast op CD8<sup>+</sup>-deficiënte dieren, vertoonden de dieren echter geen weerstand tegen EAE. Dit doet vermoeden dat blootstelling van CD8<sup>+</sup> T-cellen aan MBP noodzakelijk is voor resistentie tegen de ziekte te bieden. Additionele studies door Jiang, Chess en collega's suggereren dat de interactie tussen CD8<sup>+</sup> Tregs en MBP-reactieve CD4<sup>+</sup> T-cellen afhankelijk is van TCR-gebaseerde herkenning van Qa-1-complexen die tot expressie worden gebracht door geactiveerde autoreactieve CD4<sup>+</sup> T-cellen. Een volgend onderzoek gebeurde met muizen die deficiënt zijn in Qa-1 door een genmutatie. Deze dieren ontwikkelen een sterk uitgesproken secundaire CD4<sup>+</sup> T-cel respons na virale infectie of immunisatie met vreemde of zelf-peptiden. Deze versterkte CD4<sup>+</sup> T-cel responsen van Qa-1-deficiënte muizen voor het murine PLP gaat gepaard met een verhoogde kans op terugkeer van de ziekte. Dit leidt tot de conclusie dat Qa-1 vermoedelijk vereist is voor een geschikte CD4<sup>+</sup> T-cel respons tegen infectie en voor resistentie tegen autoimmunitet [32, 34]. Tenslotte zijn er studies uitgevoerd om het effect van TCV in deze diersmodellen te achterhalen. Zoals eerder vermeld is TCV een experimentele behandeling die leidt tot ziekte-resistentie in EAE-modellen. Dit onderzoek toonde aan dat het therapeutisch effect van TCV in deze diersmodellen afhankelijk is van de inductie van suppressieve CD8 T-cellen die Qa-1 peptide complexen herkennen die tot expressie gebracht worden door autoreactieve CD4 T-cellen. Dit onderzoek suggereert dat het de Qa-1-TCR V $\beta$  complexen op geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen zijn die CD8<sup>+</sup>-afhankelijke suppressie activeren en auto-immunitet inhiberen [36, 37].

HLA-E is het humane functionele equivalent van Qa-1. Veel kenmerken van deze niet-klassieke MHC klasse-I moleculen zijn geconserveerd gebleven. HLA-E is net zoals Qa-1 relatief niet-polymorf. Er zijn 2 allelen van HLA-E gevonden, namelijk E\*0101 en E\*0103. Deze twee allelen worden respectievelijk HLA-E<sup>G</sup> en HLA-E<sup>R</sup> genoemd omdat ze van elkaar te onderscheiden zijn door een arginine (-E<sup>R</sup>) of een glycine (-E<sup>G</sup>) op positie 107 van het proteïne. HLA-E<sup>G</sup> en HLA-E<sup>R</sup> worden met een bijna gelijke frequentie aangetroffen [38]. Een tweede gelijkens is dat zowel de murine als de humane vorm van de proteïne bij voorkeur binden aan homologe nonapeptides afkomstig van MHC klasse-Ia moleculen. De gevormde complexen functioneren als liganden voor CD94/NKG2 receptoren. Studies hebben aangetoond dat HLA-E ook kan binden aan andere peptiden afkomstig van virussen (zoals het cytomegalovirus), *heat shock protein* en TCR V $\beta$  [19, 39, 40]. Wanneer HLA-E een complex vormt met TCR V $\beta$  afgeleide peptiden, wordt dit herkend door een  $\alpha\beta$ -TCR op het oppervlak van CD8<sup>+</sup> T-cellen. Door deze V $\beta$  herkenning, lyseren de CD8<sup>+</sup> T-cellen de autologe CD4<sup>+</sup> T-cellen [19]. Een volgende overeenkomst tussen Qa-1 en HLA-E is dat ze beide tot expressie op het oppervlakte van geactiveerde T-cellen. Studies van Li et al stellen dat rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen, die HLA-E/MHC klasse I peptides

tot expressie brengen, voornamelijk een inhibitorisch effect uitoefenen via CD94/NKG2A of CD94/NKG2C ligatie. Een tweede hypothese uit deze studie is dat de geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen voldoende HLA-E/V $\beta$  complexen tot expressie brengen om CTL te activeren via TCR ligatie zonder inhibitorische signalen via CD94/NKG2A teweeg te brengen [19].

De rol van HLA-E bij auto-immuniteit is echter nog onduidelijk maar de gelijkenissen met Qa-1 doen een gelijkaardige functie vermoeden.

#### **1.4 Doel van de stage**

In deze stage wordt de rol van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen in multiple sclerose bestudeerd.

MBP-reactieve T-cellen spelen een belangrijke rol bij MS. Een eerste stap in het onderzoek is daarom het genereren van MBP-reactieve T-celklonen. Deze klonen worden vervolgens gebruikt als stimulatorcellen in een co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen. Een tweede co-cultuur wordt opgezet met CD8<sup>+</sup> T-cellen en CD4<sup>+</sup> T-cellen als stimulatorcellen. Via een *in vitro* assay kunnen vervolgens HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen gedetecteerd worden. Het uiteindelijke doel is om specifieke HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-celklonen te genereren en deze vervolgens verder te karakteriseren.

De reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van stimulatorcellen wordt ook op kortere termijn bestudeerd door middel van een CFSE-assay. Hiernaast wordt ook nagegaan of de suppressie door de CD8<sup>+</sup> T-cellen HLA-E gerestricteerd is.

Vermits MS een chronische ontstekingsziekte is, wordt ten slotte de invloed van een inflammatoire omgeving op de HLA-E expressie nagegaan. Zowel het effect van de pro-inflammatoire cytokines TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$  als van het regulatorische cytokine IL-10 wordt bestudeerd. De HLA-E oppervlakte-expressie wordt nagegaan door middel van flowcytmetrische kleuringen.

Door deze studie zal er meer inzicht verworven worden in de regulatie van auto-immune responsen en in de pathogenese van MS. Op termijn kan dit aanleiding geven tot de ontwikkeling van nieuwe en meer specifieke therapieën voor MS.

## **2 MATERIAAL EN METHODEN**

---

### **2.1 Gezonde controles**

Er werd gebruik gemaakt van perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC) van 13 gezonde controles (HC, gemiddeld leeftijd: 30 jaar , 8 vrouwen, 5 mannen) voor de uitgevoerde experimenten. Tabel 2 geeft een overzicht van de gegevens met betrekking tot de gezonde controles weer.

### **2.2 Gebruikte celsuspensies, media en stimuli/antigenen.**

Een Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) werd toegepast om perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC) te isoleren. Deze cellen werden vervolgens gekweekt in RPMI-1640 waaraan 1% natrium pyruvaat, 1% niet-essentiële aminozuren (Invitrogen Life Technologies, Paisely, Schotland) en 10% geïnactiveerd foetaal kalf serum (FCS, Hyclone, Erembodegem, België) (Kweekmedium, KM) of 10% geïnactiveerd autoloog serum (autoloog medium, AM) toegevoegd werd.

Verder werd er gebruik gemaakt van humaan MBP (100 µg/ml). Dit werd geïsoleerd uit de witte stof van humane hersenen [41]. Als T-cel stimulus werd anti-CD3 (kloon 2G3, eigen productie, BIOMED, Diepenbeek, 2 µg/ml) gebruikt.

Naast PBMC werd er verder gebruik gemaakt van de myelogene leukemie kankercellijn K-562, getransfecteerd met HLA-E (Institute of Anthropology and human, Munich). Deze cellijn werd gekweekt in kweekmedium in de aan- of afwezigheid van G418 (0,4 mg/ml).

### **2.3 Genereren van MBP-reactieve T-celklonen**

Met behulp van een *limiting dilution assay* (LDA) werden MBP-reactieve T-celklonen gegenereerd. Bij deze techniek worden PBMC eerst geïsoleerd uit het bloed van gezonde controles en gekweekt in AM in 96-well microtiterplaten met U-bodem (Nunc A/S, Roskilde, Denemarken) aan een densiteit van enerzijds  $1 \times 10^5$  cellen per well en anderzijds  $2 \times 10^5$  cellen per well en dit in aanwezigheid van MBP (40 µg/ml). Na 1 week worden de culturen gerestimuleerd met MBP-gepulste, bestraalde autologe APC ( $1 \times 10^5$  cellen per well) en wordt na 24 uur interleukine-2 (IL-2, 2,5 U/ml, Roche diagnostics, Vilvoorde, België) toegevoegd.

Een week later worden de PBMC gescreend op groeipositieve lijnen via een split-well assay. Hiervoor wordt de helft van iedere well gesplitst in 4 gelijke aliquots. Aan twee hiervan worden MBP-gepulste, bestraalde APC toegevoegd, aan de andere twee niet-gepulste bestraalde APC.

Na drie dagen wordt de specificiteit bepaald met behulp van een  $^3\text{H}$ -Thymidine incorporatie assay. Na een incubatie van 16 uur worden de cellen geharvest (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, USA). Hierna wordt de radioactiviteit van  $^3\text{H}$ -Thymidine (Amersham Biosciences, Diegem, België) gemeten via een  $\beta$ -scintillatietelling. De stimulatie index (SI) werd berekend als het gemiddelde van de *counts per minute* (cpm) van PBMC met MBP-gepulste APC over het gemiddelde van de cpm van PBMC met niet-gepulste APC. Wanneer de stimulatie index gelijk of hoger is dan 3 wordt een lijn als positief beschouwd. Vervolgens worden de positieve lijnen verder uitgekloond aan 3 verschillende densiteiten, namelijk 10, 5 en 3 cellen per well en dit in aanwezigheid van bestraalde APC en *phytohaemagglutinine* (PHA, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Difco, Detroit, MI, USA) en IL-2 (5 U/ml). Screening van groeipositieven gebeurt eveneens met behulp van een split-well assay.

#### **2.4 Fenotypering van MBP-reactieve T-celklonen met behulp van fluorescence-activated cell sorting (FACS) kleuring**

Met behulp van een flowcytometrische analyse werd het fenotype van de MBP-reactieve T-celklonen van gezonde donoren onderzocht. Voor de cytometrische kleuring werden de cellen geresuspendeerd in FACS buffer (1x *phosphate buffered saline* (PBS) met 2% FCS en 0,1% natrium-azide). Vervolgens werden de cellen gedurende een half uur geïncubeerd op 4°C met antilichamen gericht tegen verschillende oppervlaktemarkers. Er werd bestudeerd of de MBP-reactieve T-celklonen CD4 of CD8 positief zijn door middel van een kleuring met antilichamen tegen de respectievelijke oppervlaktemarkers. Om de activatiestatus van deze klonen na te gaan werd een kleuring met het antilichaam tegen de activatiemerker CD25 gebruikt, namelijk anti-CD25PE (*phycoerythrin*, Becton Dickinson, Erembodegem, België). Verder werden de antilichamen anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC (*fluorescein isothiocyanate*) en anti-TCR $\gamma\delta$ -PE (Becton Dickinson, Erembodegem, België) gebruikt om het T-celreceptor gebruik van de MBP-reactieve T-celklonen te bepalen. Ten slotte werd de HLA-E expressie bepaald via het primair antilichaam 3D12, gericht tegen HLA-E (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle), dat op zijn beurt gedetecteerd wordt via het secundair *goat-anti-mouse* (GAM) IgG1 FITC-gelabeld antilichaam (Serotec, Kidlington, UK). Om de specificiteit van het secundair antilichaam na te gaan, werden de cellen enkel aangekleurd met dit secundair antilichaam. Voor de flowcytometrische analyse werd er gebruik gemaakt van de BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Erembodegem, België) en BD Cellquest software. Hierbij werd er in eerste instantie een gate geplaatst op de levende lymfocyt populatie. Binnen deze populatie werd vervolgens de HLA-E expressie, de activatiestatus en het TCR gebruik bestudeerd.

## **2.5 Isolatie van CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen**

CD4<sup>+</sup> T-cellen kunnen rechtstreeks uit humaan bloed geïsoleerd worden met behulp van *RosetteSep*. Daarnaast werd er gebruik gemaakt van een alternatieve methode voor de isolatie van CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen uit de PBMC-fractie. In deze strategie werd de gewenste celpopulatie negatief geselecteerd met behulp van *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS).

### 2.5.1 Isolatie van CD4<sup>+</sup> T-cellen met behulp van RosetteSep

Om CD4<sup>+</sup> T-cellen rechtstreeks uit humaan bloed te isoleren werd gebruik gemaakt van de *RosetteSep Human CD4<sup>+</sup> T cell enrichment cocktail* (Stemcell Technologies, België). Humaan bloed wordt met deze cocktail geïncubeerd op kamertemperatuur. Tijdens deze incubatie worden alle niet-CD4<sup>+</sup> T-cellen van het humaan bloed gekoppeld aan de rode bloedcellen via antilichamen, waardoor hun densiteit verhoogt zodat ze samen met de rode bloedcellen neerslaan tijdens de Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie. Enkel de gezuiverde CD4<sup>+</sup> T-cellen blijven over in de witte ring en kunnen gecollecteerd worden.

### 2.5.2 Isolatie van CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen met behulp van Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Een alternatieve methode om een celfractie te isoleren is door middel van MACS. Met behulp van Ficoll histopaque densiteitscentrifugatie worden PBMC uit het bloed van gezonde controles geïsoleerd. De gewenste populatie wordt vervolgens bekomen door een negatieve selectie via *magnetic beads* (Miltenyi Biotec BV, Utrecht, Nederland) toe te passen. Voor de isolatie van CD4<sup>+</sup> T-cellen werden PBMC geïncubeerd op 4°C met biotine gekoppelde antilichamen gericht tegen CD8<sup>+</sup> T cellen,  $\gamma/\delta$  T cellen, B cellen, NK cellen, dendritische cellen, monocyten, granulocyten, en erythroïd cellen. Voor de isolatie van CD8<sup>+</sup> T-cellen werden de PBMC geïncubeerd met een gelijkaardig antilichaamcocktail, maar met antilichamen gericht tegen CD4<sup>+</sup> T-cellen in plaats van tegen CD8<sup>+</sup> T-cellen. Tenslotte werd de volledige celsuspensie opgelost aan een densiteit van maximum  $2 \times 10^8$  cellen/ml. Deze suspensie werd tot slot aangebracht op een LS kolom, geplaatst op de MACS separator. De ongelabelde en gewenste populatie (CD4<sup>+</sup> T-cellen / CD8<sup>+</sup> T-cellen) passeert door de scheidingskolom onderworpen aan een magnetisch veld en kan op die manier gecollecteerd worden.

Voor beide technieken werd de zuiverheid van de geïsoleerde celpopulatie telkens gecontroleerd via flowcytometrie.

De antilichamen anti-CD56-PE, anti-CD19-PE werden gebruikt om respectievelijk *Natural killer* (NK)-cellen en B-cellen aan te kleuren ter controle van de positief geselecteerde cellen. T-cellen werden aangekleurd met antilichamen gericht tegen de

oppervlaktemerkers CD4 en CD8, namelijk anti-CD4-Percp (*peridin chlorophyll protein*) en anti-CD8-PE (Becton Dickinson, Erembodegem, België).

## **2.6 Lange termijn co-cultuur**

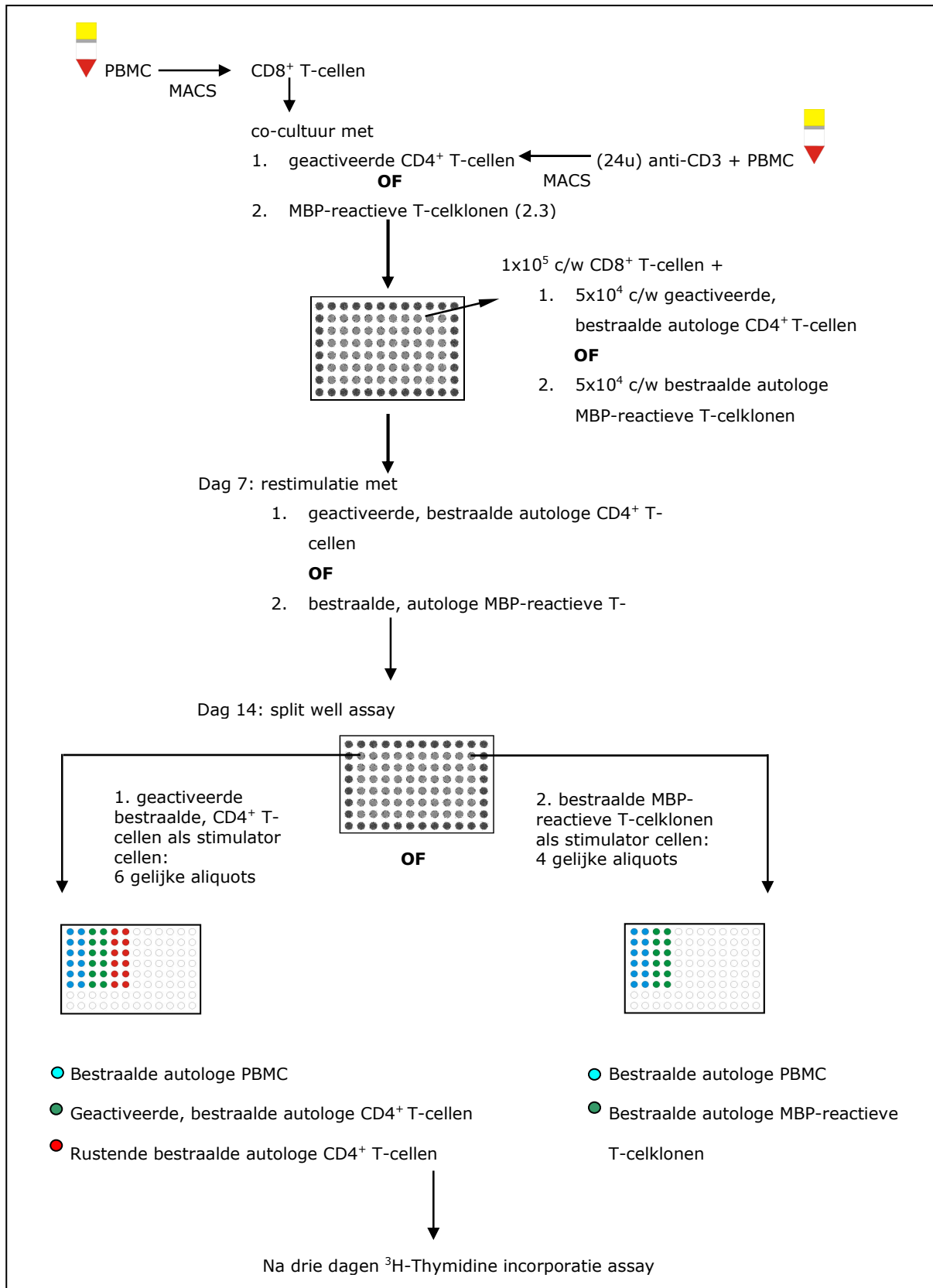
Via een co-cultuursysteem werd de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van verschillende stimulatorcellen nagegaan. Enerzijds werd de reactiviteit ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen bepaald en anderzijds ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen zoals aangegeven in figuur 3.

Voor de co-cultuur van CD8<sup>+</sup> T-cellen en geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen werden PBMC eerst gestimuleerd met anti-CD3 (2 µg/ml) gedurende 24 uur om een maximale HLA-E expressie op de CD4<sup>+</sup> T-cellen te verkrijgen. Na 24 uur werden de geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen geïsoleerd uit de gestimuleerde PBMC fractie via MACS zoals beschreven in paragraaf 2.4.2. CD8<sup>+</sup> T-cellen werden eveneens geïsoleerd uit PBMC van dezelfde donor. In 60 wells van een 96-well microtiterplaat met U-bodem werden CD8<sup>+</sup> T-cellen uitgeplaat aan een concentratie van  $1 \times 10^5$  cellen per well. Deze CD8<sup>+</sup> T-cellen werden vervolgens in co-cultuur gebracht met de geïsoleerde, geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen ( $5 \times 10^4$ ) die op voorhand bestraald werden.

Vervolgens werden de CD8<sup>+</sup> T-cellen na 1 week gerestimuleerd met dezelfde op voorhand geactiveerde (24 uur) en bestraalde autologe CD4<sup>+</sup> T-cellen. Op dag 14 werden de cellen via een split-well assay getest op groeipositieve lijnen zoals aangegeven in paragraaf 2.3. Hier werd echter de helft van iedere well verdeeld over 6 gelijke aliquots. Aan twee hiervan werden bestraalde, autologe PBMC toegevoegd, aan de volgende twee wells werden vooraf gestimuleerde (24 uur), bestraalde autologe CD4<sup>+</sup> T-cellen toegevoegd en aan de overige 2 werden rustende, bestraalde autologe CD4<sup>+</sup> T-cellen.

Een tweede co-cultuur werd opgezet met CD8<sup>+</sup> T-cellen en MBP-reactieve T-celklonen. Hiervoor werden MBP-reactieve T-celklonen gegenereerd zoals beschreven in 2.3. De CD8<sup>+</sup> T-cellen werden opnieuw geïsoleerd via MACS. De geïsoleerde CD8<sup>+</sup> T-cellen werden uitgeplaat aan een dichtheid van  $1 \times 10^5$  cellen per well. Hieraan werden de MBP-reactieve T-celklonen toegevoegd aan een dichtheid van  $5 \times 10^4$  cellen per well. Op dag 7 werden de CD8<sup>+</sup> T-cellen gerestimuleerd met dezelfde bestraalde MBP-reactieve T-celklonen. Na 2 weken werden groeipositieve lijnen gescreend via een split-well assay. Hierbij werd de helft van elke well opgedeeld in 4 gelijke aliquots. Aan twee hiervan werden bestraalde autologe PBMC toegevoegd, aan de overige twee wells werden autologe, bestraalde MBP-reactieve T-celklonen toegevoegd.

Bij toepassing van beide co-culturen werd telkens de HLA-E expressie en activatiestatus van beide type stimulatorcellen nagegaan met behulp van flowcytometrie.

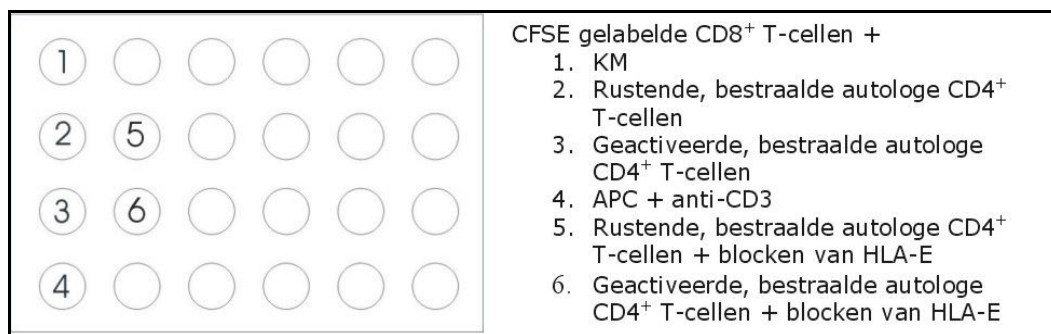


**Figuur 3: Co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen en stimulator cellen.**

1. geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen en 2. MBP-reactieve T-celklonen

## 2.7 Korte termijn co-cultuur

Om de proliferatie van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van vooraf geactiveerde autologe CD4<sup>+</sup> T-cellen op kortere termijn na te gaan werd de *5,6-carboxylfluoresceïn diacetate succinimidyl ester* (CFSE) assay toegepast. Deze techniek detecteert, identificeert en kwantificeert prolifererende T-cellen in vitro op basis van een verdunning van de fluorescerende kleurstof CFSE, waarmee de cellen op voorhand gelabeld zijn. CFSE is opgebouwd uit twee acetaat gedeeltes en een functionele groep namelijk een succinimidyl ester. CFSE wordt intracellulair opgenomen en wordt met behulp van esterases gemodificeerd zodat CFSE niet meer doorheen de celmembraan kan en een fluorescent signaal gegenereerd wordt. De succinimidyl ester reageert met vrije aminogroepen waardoor *dye-protein* complexen gevormd worden. Bij elke celdeling halveert de fluorescentie van de CFSE gelabelde cellen door een gelijkmatige verdeling over de dochtercellen. De gedeelde fractie kan eenvoudig geïdentificeerd worden via flow cytometrie [42].



**Figuur 4: CFSE-assay van CD8<sup>+</sup> T-cellen en rustende of geactiveerde bestraalde autologe CD4<sup>+</sup> T-cellen zonder of met blokken van HLA-E.**

De geïsoleerde CD8<sup>+</sup> T-cellen werden gelabeld met 2µM CFSE (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Nederland) aan een labelingsconcentratie van 20 miljoen cellen/ml. Ongebonden CFSE werd gewassen door de CD8<sup>+</sup> T-cellen 30 minuten te incuberen op 37°C in KM. Vervolgens werd een co-cultuur opgezet van deze gelabelde CD8<sup>+</sup> T-cellen aan een dichtheid van 1x10<sup>5</sup> cellen per well met enerzijds rustende en anderzijds geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen (1x10<sup>5</sup> cellen per well). De rustende T-cellen werden bekomen via RosetteSep. De geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen werden na 24 uur geïsoleerd uit anti-CD3 gestimuleerde PBMC zoals eerder beschreven. Een co-cultuur van CD8<sup>+</sup> T-cellen met APC en anti-CD3 werd gebruikt als positieve controle, als negatieve controle werden CD8<sup>+</sup> T-cellen niet gestimuleerd (KM). Parallel hieraan werd er nagegaan of de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van CD4<sup>+</sup> T-cellen afhankelijk is van HLA-E. Hiervoor werd een antilichaam gericht tegen HLA-E (3D12) toegevoegd aan de CD4<sup>+</sup> T-cellen (rustende en geactiveerde) alvorens deze cellen toe te voegen aan de CD8<sup>+</sup> T-



cellen (figuur 4). Na 5 dagen werd de proliferatieve respons van de CD8<sup>+</sup> T-cellen bepaald met behulp van flow-cytometrie.

## **2.8 Analyse van de invloed van cytokinestimulatie op de HLA-E expressie**

De invloed van pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  (Immunotools, Friesoyte, Duitsland) en het regulatoire cytokine IL-10 (Immunotools, Friesoyte, Duitsland) op de HLA-E expressie werd bestudeerd met behulp van flow cytometrie. Hiervoor werden PBMC geïsoleerd uit het bloed van gezonde donoren. Deze PBMC werden uitgeplaat in een 24-well plaat aan een dichtheid van  $2 \times 10^6$  cellen/ml. De PBMC werden gedurende 24 uur gestimuleerd met IFN- $\gamma$  (10 ng/ml of 100 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml of 100 ng/ml), een combinatie van IFN- $\gamma$  (10 ng/ml of 100 ng/ml) en TNF- $\alpha$  (10 ng/ml of 100 ng/ml) en met IL-10 (15 ng/ml of 150 ng/ml). Parallel hieraan werden PBMC gestimuleerd met anti-CD3 (2  $\mu$ g/ml) in combinatie met de cytokines. Na 24 uur werd de HLA-E expressie bestudeerd bij de verschillende condities met behulp van flow cytometrie. Hiervoor werden de PBMC na 24 uur een half uur geïncubeerd met antilichamen gericht tegen HLA-E (3D12/GAM-FITC) en tegen CD4 (anti-CD4-PerCP). Voor de flowcytometrische analyse werd er een gate geplaatst op de levende lymfocytpopulatie. De HLA-E oppervlakexpressie werd bestudeerd op CD4<sup>+</sup> T-cellen binnen de levende lymfocytpopulatie.

### **3 RESULTATEN**

---

In deze stage wordt de rol van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen in multiple sclerose bestudeerd.

Allereerst werden hiervoor MBP-reactieve T-celklonen gegenereerd. Deze MBP-reactieve T-celklonen werden vervolgens als stimulatorcellen gebruikt in een co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen. Een tweede co-cultuur werd opgezet met CD8<sup>+</sup> T-cellen en geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen als stimulatorcellen. Op deze manier kan de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van verschillende stimulatorcellen bestudeerd worden. Vervolgens kunnen reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen verder gesubcloneerd worden om specifieke HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-celklonen te genereren.

Om de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van stimulatorcellen te bepalen op kortere termijn werd er gebruik gemaakt van de CFSE assay.

Vermits MS een inflammatoire aandoening is, wordt in een laatste onderdeel van deze onderzoeksstage het effect van een inflammatoire omgeving bestudeerd. Zowel de invloed van de pro-inflammatoire cytokines TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$  als van het regulatoire cytokine IL-10 op de HLA-E expressie wordt nagegaan.

#### **3.1 MBP-reactieve T-celklonen**

##### 3.1.1 Genereren van MBP-reactieve T-celklonen

Voor het genereren van MBP-reactieve T-celklonen werd een LDA uitgevoerd voor 10 gezonde donoren. De screening op groeipositieve lijnen gebeurde via een split-well assay gevolgd door een <sup>3</sup>H-Thymidine incorporatie assay. De positieve lijnen werden vervolgens verder uitgekloond en op een later tijdstip opnieuw gescreend.

Uit 6 van de 10 gezonde donoren werden MBP-reactieve T-celklonen gegenereerd. De SI van de positieve lijnen en de hieruit verkregen MBP-reactieve T-celklonen van deze donoren worden weergegeven in tabel 2. Twee positieve lijnen (HC2-1-D9(1) en HC5-2-B9(1)) hebben echter een SI die lager ligt dan 3 (2,45 en 2,7). Na het uitklonen van deze lijnen bleek de SI van de MBP-reactieve T-celklonen echter voldoende hoog te zijn (22,07 en 52,50), wat op een hoge specificiteit duidt. De overige positieve lijnen en de MBP-reactieve T-celklonen hieruit gegenereerd hadden telkens een SI hoger dan 3.

**Tabel 2: Overzicht van stimulatie indexen (SI) van de positieve lijnen en daaruit afgeleide MBP-reactieve T-celklonen.**

Donor	Lijn	Kloon	SI Lijn / Kloon
HC1	2-D9		4,38
		2-D9(1) *	7,45
		2-D9(2) *	106,09
		2-D9(3) *	12,52
		2-D9(4) *	29,41
		2-D9(5) *	12,24
		2-D9(6) *	25,63
HC2	1-D2		3,42
		1-D2(1)	4,23
		1-D(2)	4,54
	1-D9		2,45
		1-D9(1)	22,07
HC3	1-F4		7,25
		1-F4(1) *	74,37
		1-F4(2)	43,95
		1-F4(3)	26,54
		1-F4(4)	43,91
		1-F4(5)	23,55
		1-F4(6)	45,56
	1-F5		5,59
		1-F5(1) *	15,39
	2-B3		4,57
		2-B3(1) *	58,85
		2-B3(2) *	17,68
		2-B3(3)	18,54
	2-B5		4,84
		2-B5(1)	12,58
HC4	1-G7		3
		1-G7(1) *	7,7
HC5	2-B9		2,7
		2-B9(1) * #	52,5
HC6	2-G10		4,7
		2-G10(1) * #	314,4

De MBP-reactieve T-celklonen aangeduid met een \* werden gebruikt voor de fenotypering (paragraaf 3.1.2), deze aangeduid met een # werden gebruikt als stimulatorcellen voor een co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen (paragraaf 3.2)

### 3.1.2 Fenotypering van MBP-reactieve T-celklonen met behulp van *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)

De gegenereerde MBP-reactieve T-celklonen werden in een tweede luik van de studie onderzocht op verschillende fenotypische merkers via flowcytometrie. In eerste instantie werd bestudeerd of ze een T-helper (CD4) of een cytotoxisch (CD8) fenotype vertonen. Ten tweede werd het TCR-type van de MBP-reactieve T-celklonen bepaald. De activatiestatus van de MBP-reactieve T-celklonen werd nagegaan via de analyse van de CD25 oppervlakte-expressie. Ten slotte werd de HLA-E oppervlakte-expressie van de MBP-reactieve T-cellen bestudeerd. MBP-reactieve T-celklonen van 5 gezonde donoren (\* tabel 2) werden onderzocht voor de verschillende fenotypische merkers.

Tabel 3 geeft een overzicht van het percentage CD4<sup>+</sup> T-cellen binnen de populatie van de verschillende MBP-reactieve T-celklonen. Deze resultaten geven aan dat MBP-reactieve T-celklonen van 4 donoren het CD4<sup>+</sup> fenotype vertonen met een percentage gaande van 93,53% tot 99,83%. Bij 1 donoor had de MBP-reactieve T-celkloon (HC4-1-G7(1)) echter een laag percentage CD4<sup>+</sup> T-cellen (20,21%) en vertoonde eveneens een cytotoxisch fenotype (67,37%). Hieruit kan geconcludeerd worden deze kloon niet zuiver is.

**Tabel 3: Percentage CD4<sup>+</sup> T-cellen binnen MBP-reactieve T-celklonen.**

Donor	Kloon	Percentage CD4 <sup>+</sup> T-cellen (%)	Percentage CD8 <sup>+</sup> T-cellen (%)
<b>HC1</b>	2-D9(1)	99,20	0,70
	2-D9(2)	96,53	0,01
	2-D9(3)	98,97	0,03
	2-D9(4)	98,11	0,01
	2-D9(5)	99,83	0,10
	2-D9(6)	98,83	0,15
<b>HC3</b>	1-F4(1)	99,74	0,23
	1-F5(1)	98,75	0,90
	2-B3(1)	99,62	0,18
	2-B3(2)	99,71	0,21
<b>HC4</b>	1-G7(1)	20,21	67,37
<b>HC5</b>	2-B9(1)	96,68	
<b>HC6</b>	2-G10(1)	93,53	0,18

Om het T-celreceptor subtype van de MBP-reactieve T-celklonen te bepalen, werden antilichamen anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC en anti-TCR $\gamma\delta$ -PE gebruikt. Het TCR-gebruik van de geanalyseerde MBP-reactieve T-celklonen is weergegeven in tabel 4. Deze data tonen aan dat de MBP-reactieve T-celklonen vooral een TCR $\alpha\beta$  fenotype vertonen, gaande van 97,53% tot 99,83%. MBP-reactieve T-celklonen afkomstig van 2 donoren (HC3-2-B3(2)

en HC4-1-G7(1)) vertonen echter een laag TCR $\alpha\beta$ -gebruik, namelijk 9,94% en 2,58%. Deze twee MBP-reactieve T-celklonen vertonen respectievelijk voor 0,05% en 21,69% het TCR $\gamma\delta$ -fenotype. Het gaat hier vermoedelijk om CD4<sup>+</sup> TCR<sup>-</sup> cellen.

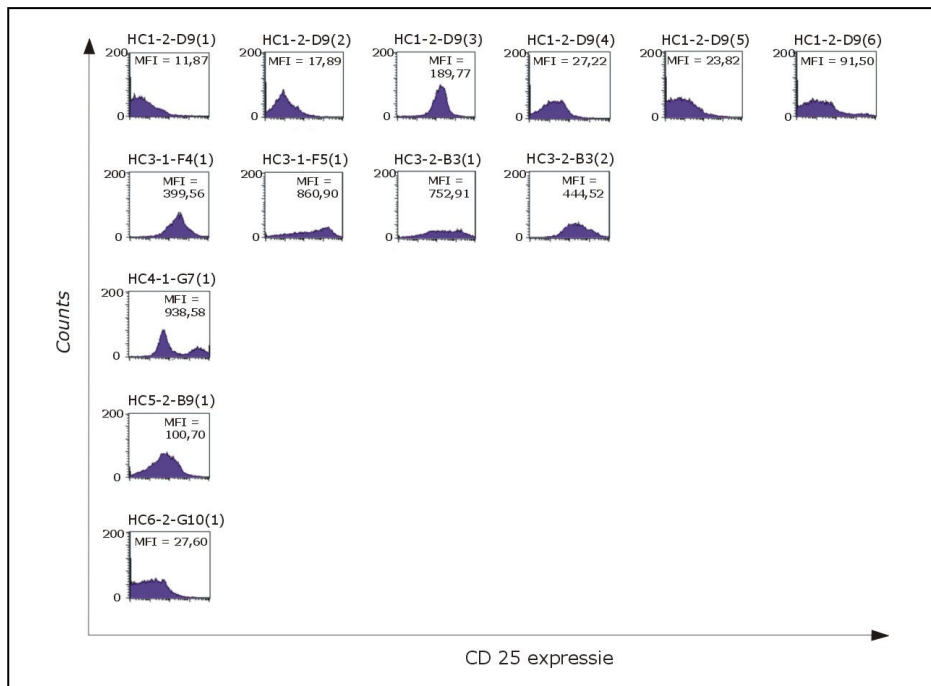
**Tabel 4: Percentage MBP-reactieve T-celklonen met een TCR $\alpha\beta$  gebruik.**

Donor	Kloon	Percentage TCR $\alpha\beta$ gebruik (%)	Percentage TCR $\gamma\delta$ gebruik (%)
<b>HC1</b>	2-D9(1)	99,70	0,22
	2-D9(2)	99,75	0
	2-D9(3)	99,91	0,01
	2-D9(4)	99,73	0,01
	2-D9(5)	99,88	0
	2-D9(6)	99,92	0,01
<b>HC3</b>	1-F4(1)	97,61	0
	1-F5(1)	97,58	0,03
	2-B3(1)	99,31	0,01
	2-B3(2)	9,94	0,05
<b>HC4</b>	1-G7(1)	2,58	21,69
<b>HC5</b>	2-B9(1)	99,61	0
<b>HC6</b>	2-G10(1)	99,78	0

Om de activatiestatus van de MBP-reactieve T-cellen na te gaan, werd de CD25 oppervlakte-expressie geanalyseerd. Figuur 5 geeft een overzicht weer van het CD25 expressiepatroon van de MBP-reactieve T-celklonen. De resultaten tonen aan dat alle geanalyseerde MBP-reactieve T-celklonen CD25 tot expressie brengen. De *mean fluorescence intensity* (MFI) van de CD25 expressie varieert echter sterk, gaande van een MFI van 11,87 tot een MFI van 938,58. De activatiestatus varieert zowel binnen MBP-reactieve T-celklonen afkomstig van 1 donor als binnen MBP-reactieve T-celklonen afkomstige van verschillende donoren. Dit is te wijten aan het feit dat de verschillende klonen op verschillende tijdstippen gestimuleerd werden.

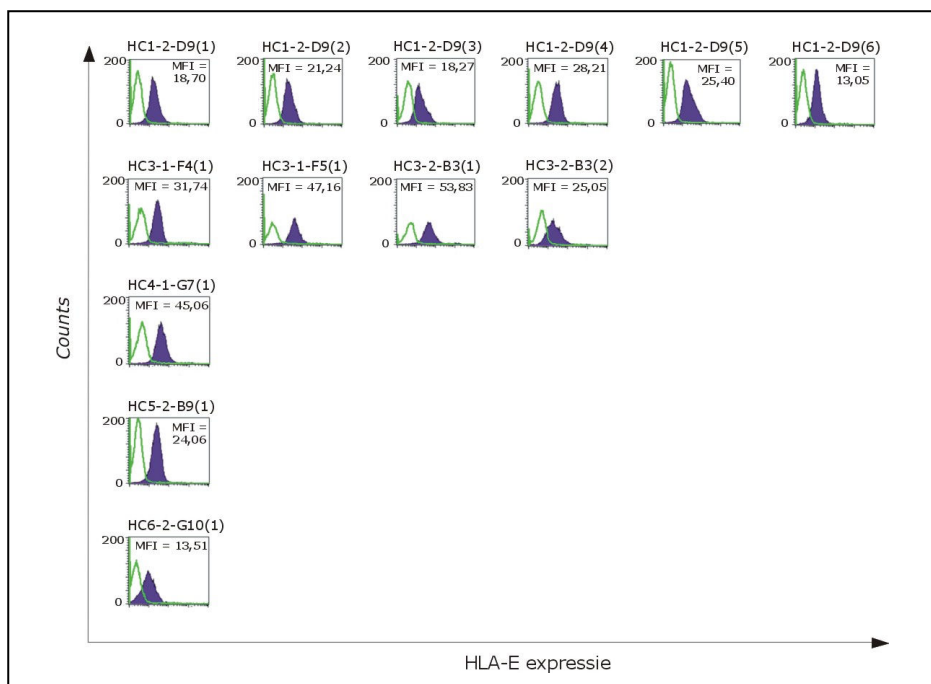
Tot slot werd de HLA-E expressie bestudeerd om na te gaan of deze MBP-reactieve T-cellen gebruikt konden worden als stimulatorcellen voor *in vitro* assay om HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen te detecteren.

De HLA-E expressie van de geanalyseerde MBP-reactieve T-celklonen is weergegeven in figuur 6. Uit de resultaten blijkt dat alle MBP-reactieve T-celklonen HLA-E tot expressie brengen met een MFI gaande van 13,05 tot 53,83. Net zoals de CD25-expressie varieert de HLA-E expressie zowel binnen de MBP-reactieve T-celklonen van 1 donor als binnen MBP-reactieve T-celklonen van verschillende donoren. Uit figuur 7 blijkt bovendien dat er een positieve, significante correlatie is ( $R^2 = 0,7697$ ) tussen de CD25 expressie en de HLA-E expressie op het oppervlak van MBP-reactieve T-celklonen ( $p < 0,05$ ).



**Figuur 5: De activatiestatus van de MBP-reactieve T-celklonen.**

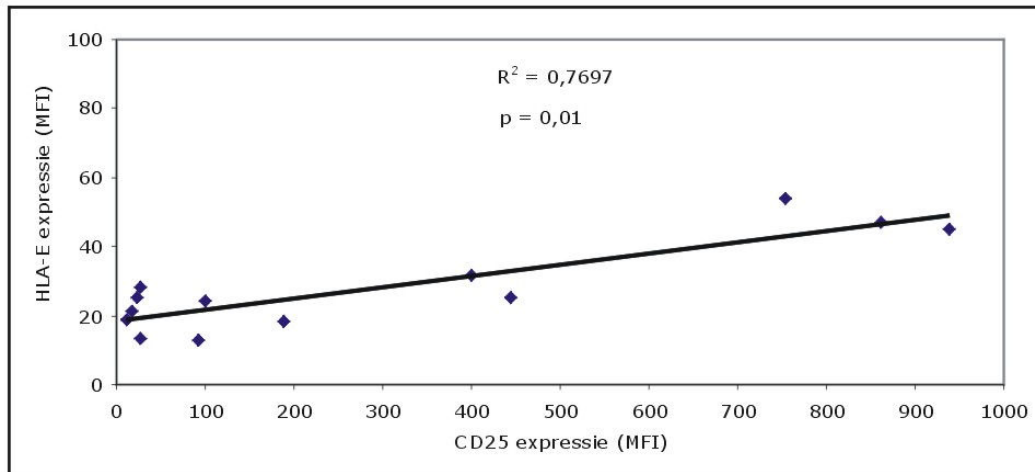
MBP-reactieve T-celklonen afkomstig van 5 gezonde donoren werden gefenotypeerd met behulp van flowcytometrie. De activatiestatus werd bepaald via analyse van de CD25 oppervlakte-expressie door middel van het antilichaam anti-CD25-PE.



**Figuur 6: HLA-E oppervlakte-expressie van de MBP-reactieve T-celklonen.**

De HLA-E oppervlakte-expressie op de verschillende MBP-reactieve T-celklonen werd eveneens bepaald met behulp van flowcytometrie. De HLA-E expressie werd bepaald via het primair antilichaam 3D12 dat op zijn beurt gedetecteerd werd via het secundair antilichaam (GAM IgG1-FITC) (■).

Om de specificiteit van het secundair antilichaam na te gaan, werden de cellen enkel aangekleurd met dit secundair antilichaam (■).



**Figuur 7: Correlatie tussen CD25-expressie en HLA-E expressie op het oppervlak van MBP-reactieve T-celklonen.**

De resultaten van de fenotypering van de MBP-reactieve T-celklonen tonen aan dat bijna alle geanalyseerde cellen een T-helper fenotype hebben en dat ze functioneren via TCR $\alpha\beta$ -gebruik. Verder blijkt uit de analyse dat de MBP-reactieve T-celklonen geactiveerd zijn en dat ze HLA-E tot expressie brengen maar dat het HLA-E expressieniveau evenals het CD25 expressieniveau varieert per kloon. Bovendien is er een positieve correlatie tussen de CD25 oppervlakte-expressie en de HLA-E oppervlakte-expressie.

### **3.2 Co-cultuur van CD8<sup>+</sup> T-cellen en stimulatorcellen**

Om de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van verschillende stimulatorcellen te bepalen werd een co-cultuur opgezet van CD8<sup>+</sup> T-cellen met enerzijds MBP-reactieve T-celklonen en anderzijds geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen. Een eerste methode om de reactiviteit te bepalen is via een LDA. Het uiteindelijke doel van deze assay is de detectie van reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen waaruit vervolgens specifieke HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-celklonen gegenereerd kunnen worden.

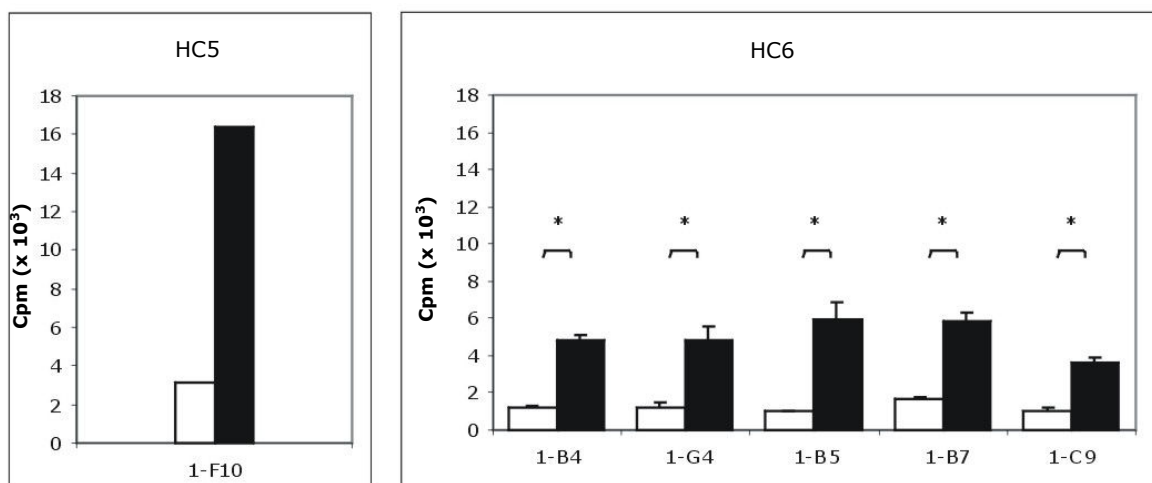
Om de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen op kortere termijn te analyseren en rechtstreeks het fenotype te bepalen van de reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen werd gebruik gemaakt van een CFSE assay.

#### **3.2.1 Limiting dilution assay**

Voor de uiteindelijke generatie van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-celklonen werd in eerste instantie de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen bestudeerd ten opzichte van enerzijds MBP-reactieve T-celklonen en anderzijds geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen via een co-cultuur systeem.

### A) MBP-reactieve T-celklonen als stimulatorcellen

De gebruikte MBP-reactieve T-celklonen voor deze LDA zijn afkomstig van de twee gezonde donoren, aangeduid met een # in tabel 4. CD8<sup>+</sup> T-cellen werden in co-cultuur gebracht met deze MBP-reactieve T-celklonen en na 7 dagen gerestimuleerd met dezelfde T-celkloon. De screening gebeurde via een split well assay gevolgd door een <sup>3</sup>H-Thymidine incorporatie assay. Er kon 1 positieve lijn opgepikt worden uit de co-cultuur van een eerste gezonde donor. Uit de co-cultuur van de tweede gezonde donor werden 5 positieve lijnen opgepikt (figuur 8). Een positieve lijn wordt aangegeven wanneer de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen significant hoger is dan de reactiviteit tegenover PBMC ( $p < 0,05$ ).



**Figuur 8: Reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen.**

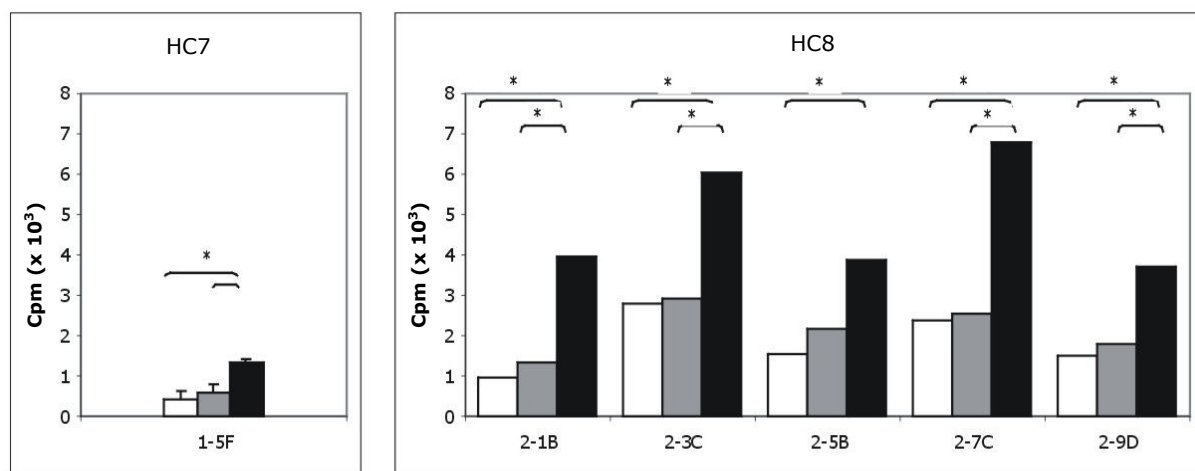
Via een co-cultuur werd de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen bestudeerd ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen. Een lijn wordt als positief beschouwd wanneer de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen (■) minstens drie maal hoger is dan de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van PBMC (□). \*  $p < 0,05$

### B) Geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen als stimulatorcellen

Naast het bepalen van de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen werd ook de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen bestudeerd. Hiervoor werd een co-cultuur van CD8<sup>+</sup> T-cellen en CD4<sup>+</sup> T-cellen afkomstig van 4 gezonde donoren geanalyseerd met behulp van de LDA. De reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen werd hier bepaald ten opzichte van PBMC, rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen en geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen. Een lijn wordt als positief beschouwd wanneer de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen minstens drie maal hoger is dan de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van PBMC en/of rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen. Uit 2 van de 4 co-culturen werden positieve lijnen gegenereerd. De resultaten hiervoor worden weergegeven in figuur 9. Uit de co-cultuur van een



eerste gezonde donor (HC7) werd 1 positieve lijn opgepikt. Hierbij is de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen significant hoger dan de reactiviteit ten opzichte van PBMC en ten opzichte van rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen ( $p < 0,05$ ). Uit de co-cultuur van de tweede donor (HC8) werden 5 positieve lijnen opgepikt. Uit de resultaten blijkt dat ook hier de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen significant hoger is dan wanneer ze gestimuleerd zijn met PBMC of met rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen ( $p < 0,05$ ). Bij 1 positieve lijn (HC8-2-5B) is de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen enkel significant hoger dan de reactiviteit ten opzichte van PBMC, maar niet ten opzichte van rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen.



**Figuur 9: Reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen.**

Via een co-cultuur werd de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen bestudeerd ten opzichte van

PBMC (■), rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen (□) en geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen (■).

De CD25 en HLA-E oppervlakte-expressie van de stimulatorcellen werden telkens bepaald via flowcytometrische kleuringen (data niet weergegeven).

\*  $p < 0,05$

### 3.2.2 CFSE assay

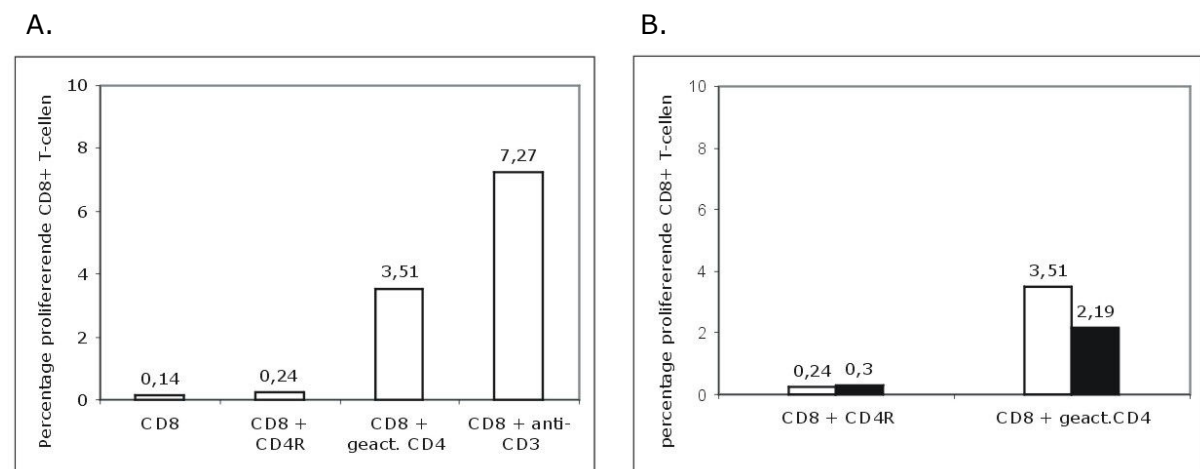
De reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van stimulatorcellen werd op kortere termijn bepaald door middel van een CFSE-assay. Voor deze assay werd er voor 1 gezonde donor een co-cultuur opgezet van CD8<sup>+</sup> T-cellen met enerzijds rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen en anderzijds geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen. Als positieve controle werden geactiveerde PBMC toegevoegd aan de CD8<sup>+</sup> T-cellen, als negatieve controle werden de CD8<sup>+</sup> T-cellen enkel in KM gekweekt. Om na te gaan of de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen HLA-E gerestricteerd was, werden parallel hieraan de CD4<sup>+</sup> T-cellen op voorhand geblokt met een antilichaam tegen HLA-E (3D12). Figuur 10 geeft een overzicht van de resultaten van deze CFSE assay.

Wanneer er geen stimulatorcellen werden toegevoegd aan de CD8<sup>+</sup> T-cellen in de co-cultuur (negatieve controle) is er geen proliferatieve respons van de CD8<sup>+</sup> T-cellen (0,14%). Bij de co-cultuur met rustende of geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen als stimulatorcellen prolifererden respectievelijk 0,24% en 3,51% van de CD8<sup>+</sup> T-cellen. Anti-CD3 geactiveerde CD8<sup>+</sup> T-cellen (positieve controle) geeft een percentage van 7,27%

De reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen is dus hoger dan de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen.

In figuur 9B worden de percentages weergegeven van het aantal prolifererende CD8<sup>+</sup> T-cellen gestimuleerd met enerzijds rustende en geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen en anderzijds rustende en geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen die opvoorhand geblokt werden voor HLA-E.

Er kan geen verschil waargenomen worden tussen het percentage van prolifererende CD8<sup>+</sup> T-cellen gestimuleerd met rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen wel en niet geïncubeerd met een antilichaam tegen HLA-E. Uit de resultaten blijkt dat de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen daarentegen met 37,61% afneemt wanneer er op voorhand geblokt wordt voor HLA-E. Een verdere optimalisatie van de CFSE assay is echter noodzakelijk.



A: Co-cultuur van CD8<sup>+</sup> T-cellen met enerzijds geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen en anderzijds rustende CD4<sup>+</sup> T-cellen. Als negatieve controle werd enkel KM toegevoegd aan de CD8<sup>+</sup> T-cellen, als postieve controle werden anti-CD3 en feeders toegevoegd aan de CD8<sup>+</sup> T-cellen.

B: Om na te gaan of de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van de stimulatorcellen HLA-E gerestricteerd is werden de CD4<sup>+</sup> T-cellen opvoorhand voor HLA-E geblokt.

■ : Blocking van HLA-E

□ : Geen blocking van HLA-E

### **3.3 Invloed van cytokines op de HLA-E expressie**

In een laatste stap in de onderzoeksstap werd de invloed van bepaalde cytokines op de HLA-E expressie onderzocht, namelijk van de pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  en van het regulatorische cytokine IL-10.

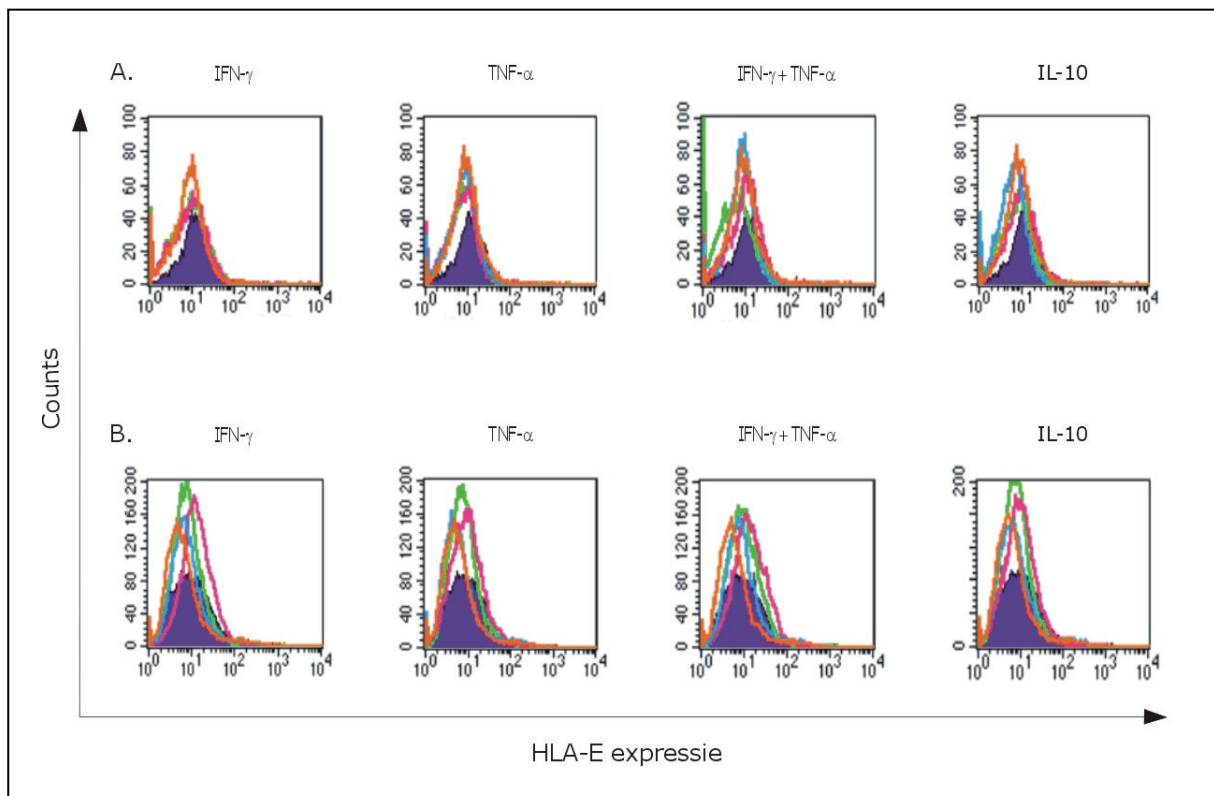
Hiervoor werden enerzijds PBMC en anderzijds K-562 cellen (getransfecteerd met HLA-E) gestimuleerd met de cytokines IFN- $\gamma$  (10 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), een combinatie van IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) en TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) en met IL-10 (15 ng/ml). De HLA-E expressie werd vervolgens nagegaan na 10 uur, 24 uur en 48 uur incubatie met de betreffende cytokines.

De pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  blijken geen invloed te hebben op de HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC op de verschillende tijdstippen (figuur 11). Ook een combinatie van deze twee cytokines beïnvloedt de HLA-E oppervlakte-expressie op PBMC niet. Er kan eveneens geen effect waargenomen worden wanneer PBMC gestimuleerd werden met IL-10.

Wanneer de K-562 cellen gedurende 24 uur gestimuleerd worden met IFN- $\gamma$  of met een combinatie van IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$ , kan een geringe stijging in HLA-E oppervlakte-expressie waargenomen worden. Het pro-inflammatoire cytokine TNF- $\alpha$  alleen beïnvloedt de HLA-E oppervlakte-expressie echter niet. Stimulatie met IL-10 heeft eveneens geen effect op de HLA-E oppervlakte-expressie van K-562 cellen.

Om na te gaan of een hogere concentratie van de cytokines een meer uitgesproken effect heeft, worden PBMC gestimuleerd met de pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) en TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) en met het regulatorische cytokine IL-10 (150 ng/ml) gedurende 24 uur. Uit de resultaten blijkt opnieuw dat stimulatie met een lage concentratie (10 ng/ml) van de cytokines geen invloed heeft op de HLA-E oppervlakte-expressie (figuur 12).

Er kan eveneens geen effect op de HLA-E oppervlakte-expressie waargenomen worden wanneer de PBMC gestimuleerd worden met IFN- $\gamma$  aan een hoge concentratie (100 ng/ml). Stimulatie met TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) daarentegen vermindert de HLA-E oppervlakte-expressie. Wanneer de PBMC gestimuleerd worden met een hoge concentratie van beide pro-inflammatoire cytokines vermindert de HLA-E oppervlakte-expressie eveneens. Een hogere concentratie van IL-10 (150 ng/ml) beïnvloedt de HLA-E oppervlakte-expressie niet.



**Figuur 11: Invloed van pro-inflammatoire en regulatoire cytokines op de HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC (A) en K-562 cellen getransfecteerd met HLA-E (B).**

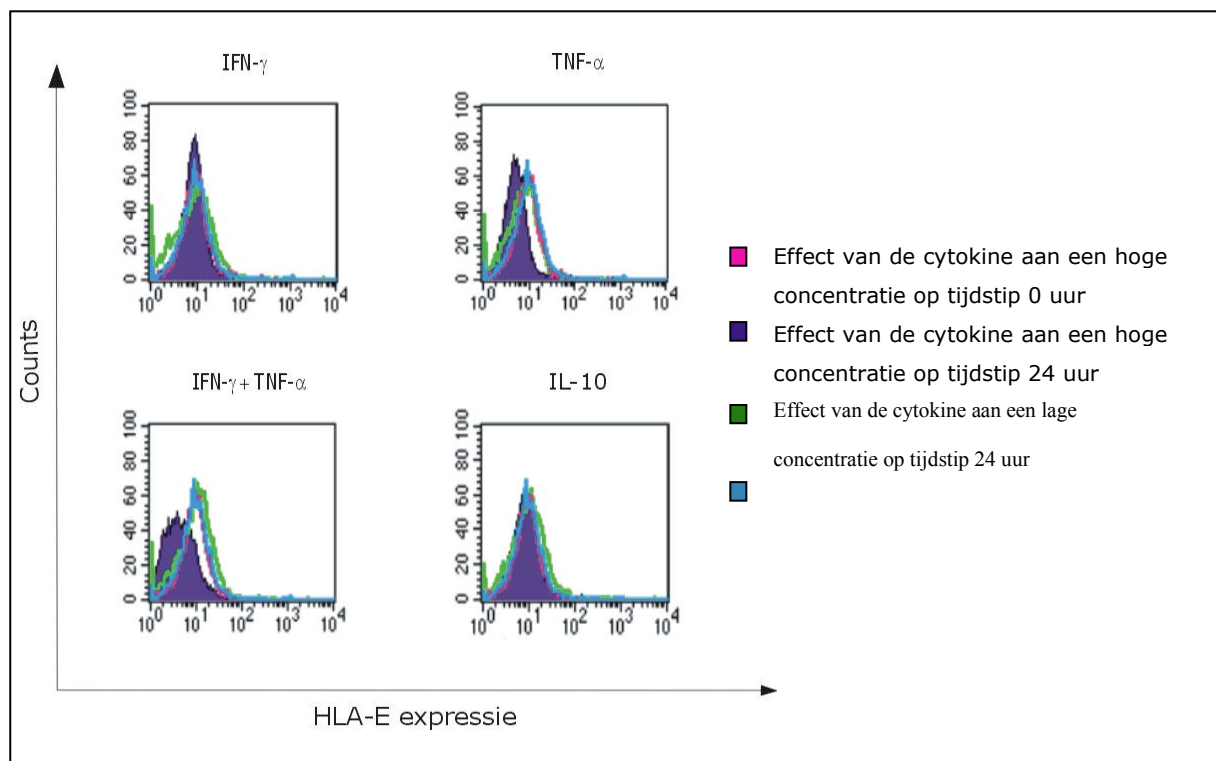
De HLA-E oppervlakte-expressie werd op de tijdstippen 0 uur (■), 10 uur (■), 24 uur (■) en 48 uur (■) bestudeerd door middel van een flowcytometrie kleuring. Als negatieve controle werd enkel KM toegevoegd aan de cellen (KM na 48 uur: ■)

Parallel aan deze twee experimenten werd het effect van de cytokines op geactiveerde T-cellen bestudeerd. Wanneer PBMC gestimuleerd worden met anti-CD3 geeft dit een opregulatie van HLA-E oppervlakte-expressie. Een maximale HLA-E oppervlakte-expressie wordt bekomen wanneer de PBMC gedurende 24 uur gestimuleerd worden met anti-CD3. Om het effect van de cytokines op deze activatie geïnduceerde opregulatie te bestuderen, werden PBMC gedurende 24 uur gestimuleerd met anti-CD3 en met de cytokines aan enerzijds een lage concentratie (10 en 15 ng/ml) en anderzijds een hoge concentratie (100 en 150 ng/ml). Figuur 13 toont aan dat bijkomende stimulatie met INF- $\gamma$  aan een concentratie van 10 ng/ml de verhoogde HLA-E expressie door anti-CD3 versterkt. Stimulatie met INF- $\gamma$  aan een concentratie van 100 ng/ml daarentegen verlaagt de HLA-E expressie op het oppervlak van de geactiveerde T-cellen. TNF- $\alpha$  beïnvloedt het effect van anti-CD3 op de HLA-E oppervlakexpressie op een gelijkaardige manier. Een lage concentratie van TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) verhoogt de HLA-E oppervlakte-expressie op geactiveerde T-cellen, een hoge concentratie aan TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) daarentegen verlaagt de HLA-E expressie op het oppervlak van geactiveerde T-cellen.

Wanneer geactiveerde T-cellen gestimuleerd worden met een combinatie van deze twee cytokines aan een lage concentratie is er geen effect op de HLA-E oppervlakte-expressie. Een hoge concentratie van beide pro-inflammatoire cytokines daarentegen vermindert de HLA-E expressie op het oppervlak van geactiveerde T-cellen

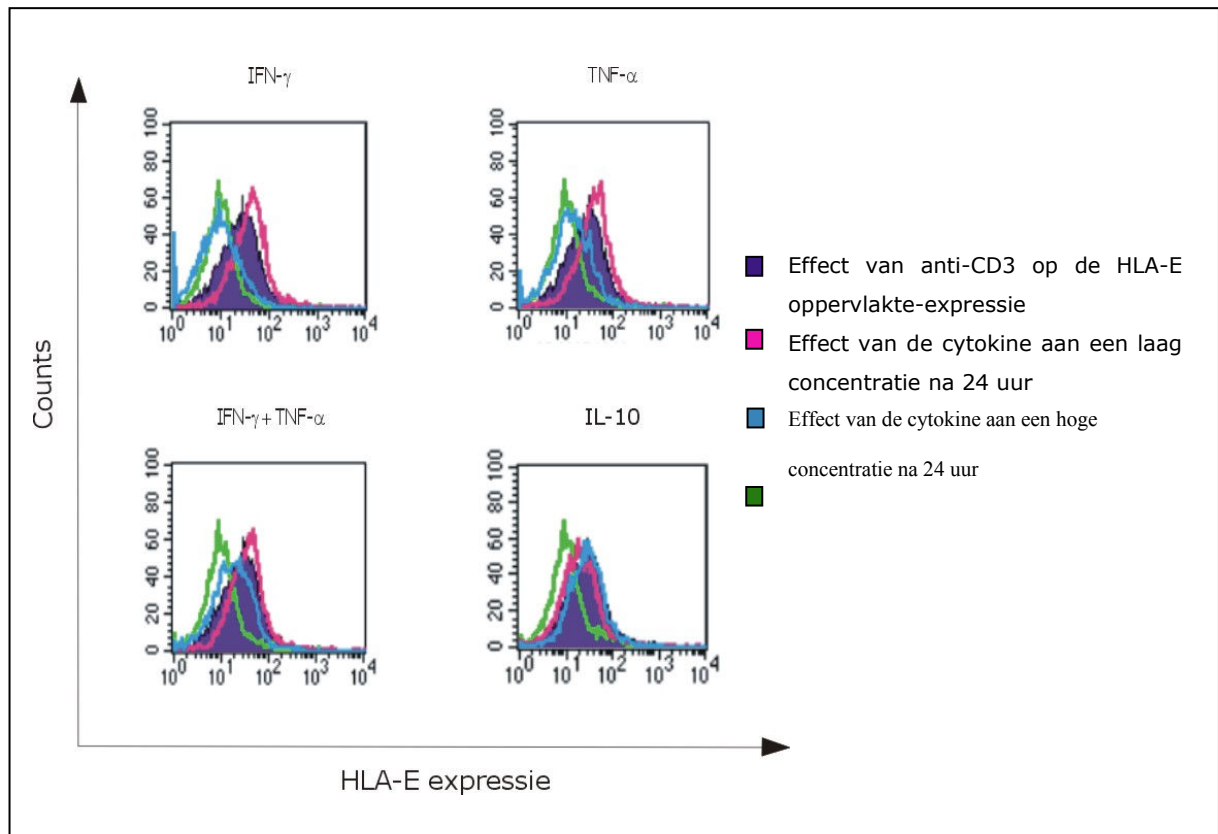
Uit de resultaten blijkt dat stimulatie van geactiveerde T-cellen met IL-10 geen invloed heeft op de HLA-E expressie, noch bij een concentratie van 15 ng/ml, noch bij een concentratie van 150 ng/ml.

De pro-inflammatoire cytokines beïnvloeden de HLA-E expressie op het oppervlak van geactiveerde T-cellen. Stimulatie van de geactiveerde T-cellen met deze cytokines aan een lage concentratie opreguleert de HLA-E oppervlakte-expressie. Een hoge concentratie van deze pro-inflammatoire cytokines daarentegen downreguleert de HLA-E expressie op het oppervlak van de geactiveerde T-cellen.



**Figuur 12: Effect van een hoge concentratie van pro-inflammatoire en regulatoire cytokines op de HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC.**

De HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC werd bestudeerd na 24 uur incubatie met IFN- $\gamma$  (100 ng/ml), TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), een combinatie van IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) en TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) en met IL-10 (150 ng/ml).



**Figuur 13: Invloed van de cytokines op het verhogend effect van anti-CD3 op de HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC.**

De HLA-E oppervlakte-expressie van PBMC werd bestudeerd na 24 uur stimulatie met anti-CD3 alleen en in combinatie met de verschillende cytokines IFN- $\gamma$  (10 ng/ml en 100 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml en 100 ng/ml), een combinatie van IFN- $\gamma$  (10 ng/ml en 100 ng/ml) en TNF- $\alpha$  (10 ng/ml en 100 ng/ml) en met IL-10 (15 ng/ml en 150 ng/ml).

## 4 DISCUSSIE

---

Multiple sclerose is een inflammatoire aandoening waarbij autoreactieve T-cellen een belangrijke rol spelen. Deze autoreactieve T-cellen komen echter ook voor bij gezonde individuen maar dit leidt dan niet noodzakelijk tot de ontwikkeling van een auto-immune aandoening. Deze autoreactieve T-cellen worden vermoedelijk onderdrukt door regulatoire mechanismen zoals regulatoire T-cellen. Regulatoire T-cellen kunnen onderverdeeld worden in twee groepen, de natuurlijk voorkomende en de geïnduceerde Tregs. Tot de geïnduceerde regulatoire T-cellen behoren onder andere de HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen. Gegevens omtrent de rol van deze cellen is echter beperkt. Het doel van deze stage is het bestuderen van de rol van deze HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen.

Een eerste stap in deze stage is het genereren van MBP-reactieve T-cellen die op hun beurt gebruikt worden als stimulatorcellen in een co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen.

De gegenereerde MBP-reactieve T-celklonen werden onderzocht op een T-helper of een cytotoxisch fenotype, TCR-subtype, activatiestatus en HLA-E oppervlakte-expressie.

Bijna alle geanalyseerde MBP-reactieve T-celklonen vertonen een CD4<sup>+</sup> fenotype en een TCRαβ-gebruik. Dit komt overeen met resultaten van studies uitgevoerd door Ben-Nun et al. Zij genereerden MBP-reactieve T-celklonen van zowel MS-patiënten als van gezonde donoren. Bijna alle gegenereerde klonen vertoonden een CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T-cel-fenotype en TCR-αβ-subtype [43]. Alle geanalyseerde MBP-reactieve T-celklonen zijn geactiveerd en brengen HLA-E tot expressie. Er is zelfs een positief verband tussen de CD25 oppervlakte-expressie en de HLA-E oppervlakte-expressie. Dit komt overeen met de gegevens die reeds gekend zijn over HLA-E en Qa-1, de murine analoog van HLA-E. Qa-1 heeft namelijk als eigenschap dat het voornamelijk voorkomt op geactiveerde cellen [21]. HLA-E daarentegen komt eveneens voor op rustende cellen maar wordt opgereguleert na activatie van de cellen [19].

Slechts twee MBP-reactieve T-celklonen vertonen een afwijkend resultaat. Een van deze klonen vertoonde zowel een laag percentage aan CD4<sup>+</sup> T-cellen als een geringe TCRαβ-gebruik. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat zowel de cellijn als die hieruit gegenereerde MBP-reactieve T-celkloon niet voldoende specifiek zijn en dat het hier gaat om een andere subtype cellen, namelijk MBP-reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen.

Vermits beide klonen naast een laag TCRαβ-gebruik ook een laag TCRγδ-gebruik vertoonden, kunnen deze cellen een TCR<sup>-</sup> fenotype hebben. Een andere verklaring is dat er mogelijk een fout is opgetreden tijdens de flowcytometrische kleuring. Een herhaling van de TCR-fenotypering voor deze twee MBP-reactieve T-celklonen zou deze resultaten kunnen verduidelijken.

In een volgende stap in het onderzoek worden HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen gedetecteerd. Hiervoor werd een co-cultuur opgesteld van CD8<sup>+</sup> T-cellen met enerzijds MBP-reactieve T-cellen en anderzijds geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen als stimulatorcellen. De reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van de stimulatorcellen werd vervolgens nagegaan via een *Limiting dilution* assay of een CFSE assay.

Met behulp van de LDA werden reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van MBP-reactieve T-celklonen alsook ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen gedetecteerd.

Om na te gaan of deze reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen HLA-E gerestricteerd is, zou een co-cultuur van CD8<sup>+</sup> T-cellen opgezet moeten worden met stimulatorcellen die op voorhand geblokt worden met een antilichaam gericht tegen HLA-E.

Reactieve CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen werden eveneens gedetecteerd via de CFSE-assay. Om na te gaan of deze reactiviteit HLA-E gerestricteerd is, werden de CD4<sup>+</sup> T-cellen op voorhand geblokt voor HLA-E. Wanneer geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen op voorhand geblokt werden voor HLA-E was er minder reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen in vergelijking met de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen die gestimuleerd werden met geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-cellen. Het verschil in reactiviteit is echter niet groot.

De CFSE-assay dient echter nog geoptimaliseerd te worden. Een eerste mogelijkheid is door de reactiviteit op een latere tijdstip te meten. Ook het restimuleren van de cellen en het toevoegen van IL-2 als groeistimulus zijn opties voor het op punt te stellen van de assay.

Een tweede manier om HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen te detecteren is met behulp van een *ex vivo* assay.

HLA-E bindt bij voorkeur aan peptides afkomstig van MHC-klasse Ia leader sequentie moleculen en deze complexen functioneren als ligand voor CD94/NKG2A receptoren. Op deze manier reguleert het HLA-E molecuul vermoedelijk NK-cellen. Hiernaast bindt HLA-E eveneens aan andere peptides en interageert op deze manier met  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> CTL. Zo bindt HLA-E onder andere aan peptides afkomstig van *heat shock*, bacteriële of virale proteïnen en kan het op deze manier interageren met TCR $\alpha\beta$  op CD8<sup>+</sup> T-cellen wat leidt tot activatie, proliferatie en expressie van de effectorfunctie van de CTL [32,34].

Er werden reeds kleuringen uitgevoerd met HLA-E tetrameren, opgeladen met Qdm [44]. Qdm, is echter een MHC-klasse Ia afgeleide peptide en dit gevormde complex interageert enkel met de CD94/NKG2A receptor op de CD8<sup>+</sup> T-cellen en niet met de TCR.

Een alternatieve manier om HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen te detecteren via een *ex vivo* assay is door PBMC rechtstreeks aan te kleuren met pentameren, opgeladen met een CMV-afgeleid peptide (VMAPRTLIL).

HLA-E bindt bij voorkeur aan peptides die Leu op positie 9 en Leu of Met op positie 2 hebben, wat het geval is bij de geselecteerde peptide [19]. De peptide Ile op positie 8 is noodzakelijk voor interactie met de T-celreceptor [40]. Verder onderzoek zal moeten



uitwijzen of detectie van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen met HLA-E/CMV-peptide pentameren mogelijk is.

Ten slotte kunnen HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> gedetecteerd worden door middel van K-562 cellen getransfecteerd met HLA-E.

Li et al. hebben MHC klasse I deficiënte humane B-cel lymfoblastoïd cellijn C1R (C1R-E) getransfecteerd met HLA-E. Deze cellen werden opgeladen met het Vβ1 peptide of het Vβ2 peptide afkomstig van respectievelijk TCR Vβ1 en TCR Vβ2. Vervolgens werden deze cellen gebruikt als stimulatorcellen in co-cultuur met CD8<sup>+</sup> T-cellen. Hieruit bleek dat TCR Vβ specifieke CD8<sup>+</sup> CTL geïnduceerd werden wanneer deze peptides bonden aan HLA-E.

Een soortgelijke studie kan uitgevoerd worden met K-562 cellen getransfecteerd met HLA-E en peptides afgeleid van TCR om HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen te detecteren.

Bij de *ex vivo* assay worden op voorhand peptides geselecteerd waarmee HLA-E pentameren opgeladen zullen worden. Via de *ex vivo* assay worden op die manier enkel CD8<sup>+</sup> T-cellen reactief tegen deze specifiek gekozen peptiden gedetecteerd en geïsoleerd.

Pentameren konden echter niet opgeladen worden met peptides afgeleid van TCR Vβ. De reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van deze peptides zal in de toekomst verder bepaald worden met behulp van K-562 cellen getransfecteerd met HLA-E. Het voordeel van deze cellen is dat ze geen klassieke MHC I moleculen tot expressie brengen maar enkel HLA-E.

Het gebruik van deze twee technieken laat toe de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen tegen de specifieke peptides te bepalen. Mogelijk zijn HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen reactief tegen een groter aantal (ongekende) peptides. Om deze reden wordt er gebruik gemaakt van de *in vitro*. Op deze manier wordt de reactiviteit van CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van andere mogelijke peptides nagegaan. Deze techniek geeft bovendien de mogelijkheid om specifieke HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-celklonen te genereren.

Vermits MS een inflammatoire ziekte is wordt in een laatste onderdeel van het onderzoek nagegaan of de HLA-E oppervlakte-expressie beïnvloed wordt door de pro-inflammatoire cytokines IFN-γ en TNF-α of het regulatoire cytokine IL-10. Enerzijds wordt er gekeken naar het effect op HLA-E expressie op het oppervlak van niet-geactiveerde cellen en anderzijds naar het effect op HLA-E oppervlakte-expressie op geactiveerde cellen.

Uit de resultaten blijkt dat stimulatie gedurende 24 uur van HLA-E getransfecteerde K-562 cellen met een lage concentratie (10ng/ml) van IFN-γ alleen of in combinatie met TNF-α de HLA-E oppervlakte-expressie in geringe mate beïnvloedt. Dit komt overeen met

de resultaten van de studies uitgevoerd door Pfizenmaier et al. Zij hebben aangetoond dat TNF- $\alpha$  behandeling van K-562 cellen, die geen HLA-klasse I expressie vertonen, niet in staat is om *de novo* expressie van noch HLA-A, B en C, noch HLA-DR genen te induceren op mRNA-niveau. TNF- $\alpha$  heeft echter wel een versterkend effect op constitutieve en IFN- $\gamma$  geïnduceerde HLA-klasse I celoppervlak antigenexpressie [47].

De HLA-E oppervlakte-expressie op niet-geactiveerde PBMC worden daarentegen niet beïnvloed wanneer ze gestimuleerd worden met een lage concentratie (10ng/ml) van pro-inflammatoire cytokines. Een hoge concentratie (100ng/ml) van TNF- $\alpha$  alleen of in combinatie met IFN- $\gamma$  verminderde de HLA-E expressie op het oppervlak van niet-geactiveerde PBMC

Zulke bevindingen zijn echter nog niet aangetoond in de literatuur. Er zijn echter wel studies uitgevoerd om de invloed van pro-inflammatoire cytokines op de HLA-E expressie op mRNA te bestuderen.

Uit studies blijkt dat het pro-inflammatoire cytokine IFN- $\gamma$  een groot aantal genen reguleert, inclusief genen van de MHC-klasse I familie. Deze regulatie van IFN- $\gamma$  gebeurt voor de meeste genen op transcriptieniveau. De promotors van de meeste MHC-klasse I genen bevatten een DNA-sequentie, de IFN-gestimuleerde respons element (ISRE). Het IFN regulatoire factor 1 (IRF-1) wordt geïnduceerd door IFN- $\gamma$  en interageert met de ISRE in klasse Ia genpromotors om transcriptie te initiëren [45].

Enkele MHC-klasse I genen daarentegen worden op posttranscriptioneel niveau gereguleert door IFN- $\gamma$ . Zo is onder andere aangetoond dat verhoogde expressie van HLA-A mRNA in aanwezigheid van IFN- $\gamma$  bijna volledig op posttranscriptioneel niveau gebeurt [45]. IFN- $\gamma$  induceert ook HLA-E expressie door de transcriptie-initiatie te verhogen, maar de HLA-E promotor bevat geen functionele ISRE. De HLA-E promotor bevat twee verschillende IFN- $\gamma$  respons elementen, de IFN respons regio (IRR) en de *upstream* respons regio (UIRR). De transcriptiefactoren Stat-1 en GATA-1 binden respectievelijk aan IRR en UIRR om transcriptie van de HLA-E promotor te reguleren [45, 46].

Het effect van pro-inflammatoire cytokines op de HLA-E expressie op het oppervlak van geactiveerde cytokines werd eveneens bestudeerd.

Wanneer cellen geactiveerd werden met anti-CD3 verhoogde de HLA-E oppervlakte-expressie. Een maximale HLA-E oppervlakte-expressie wordt bekomen na 24 uur stimulatie met anti-CD3 [44]. Bijkomstige stimulatie met een lage concentratie van pro-inflammatoire cytokines verhoogt de HLA-E oppervlakte-expressie op geactiveerde cellen. Een hoge concentratie van IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  daarentegen downreguleert HLA-E oppervlakte-expressie op geactiveerde cellen.

Een mogelijke verklaring voor het verschil in effect van stimulatie met een lage of hoge concentratie van pro-inflammatoire cytokines is dat ze dan vermoedelijk een andere

functie uitoefenen. Het is mogelijk dat TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$  een anti-inflammatoire werking hebben wanneer ze aanwezig zijn aan een lage concentratie (10 ng/ml) en een pro-inflammatoire functie uitoefenen wanneer ze aanwezig zijn aan een hoge concentratie (100 ng/ml). De aanwezigheid van IFN- $\gamma$  lijkt echter wel noodzakelijk voor een gunstig verloop van de ziekte, aangezien IFN- $\gamma$  knock-out dieren een verergering van EAE ontwikkelen [48].

De afname van HLA-E oppervlakte-expressie kan echter ook te wijten zijn aan het feit dat stimulatie met TNF- $\alpha$  aan deze hoge concentratie (100 ng/ml) toxisch is voor de cellen en dat hierdoor minder HLA-E expressie waargenomen kan worden. Om na te gaan of de cellen inderdaad apoptotisch worden na stimulatie met cytokines aan dergelijke concentraties, zou er eveneens een kleuring met 7-amino actinomycine D (7AAD) uitgevoerd moeten worden. Indien door apoptose de plasma membraan integriteit verloren is, kan 7AAD binden aan het DNA. Vroeg apoptotische cellen nemen weinig 7AAD op, laat apoptotische cellen nemen reeds veel 7AAD op [49].

Naast het bestuderen van het effect van pro-inflammatoire cytokines op de HLA-E expressie op het oppervlak van zowel rustende als geactiveerde cellen werd de invloed van het regulatorische cytokine IL-10 op de HLA-E oppervlakte-expressie nagegaan. Noch een lage (15ng/ml), noch een hoge concentratie (150ng/ml) van het cytokine heeft een effect op de HLA-E expressie op het oppervlak van rustende en geactiveerde cellen.

Het doel van deze onderzoekstage was de rol van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen bestuderen.

In eerste instantie werden CD8<sup>+</sup> T-cellen gedetecteerd door middel van een *in vitro* assay. Er moet echter nog nagegaan worden of de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van de stimulatorcellen HLA-E gerestricteerd is.

Zowel de *Limiting dilution assay* als de CFSE assay dienen geoptimaliseerd te worden om de reactiviteit van de CD8<sup>+</sup> T-cellen ten opzichte van de stimulatorcellen te bepalen.

De *ex vivo* assay met HLA-E pentameren, opgeladen met peptides afkomstig van CMV, moet eveneens nog op punt gesteld worden om HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen te detecteren.

Wanneer de detectie en de isolatie van de HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen geoptimaliseerd is, kunnen vervolgens specifieke klonen gegenereerd worden. Vervolgens kunnen deze gefenotypeerd worden en kunnen hun suppressieve eigenschappen nagegaan worden om meer inzicht te krijgen in de rol van deze cellen.

In een laatste stap van het onderzoek werd nagegaan of een inflammatoire omgeving een invloed heeft op de HLA-E oppervlakte-expressie. Hiervoor werd zowel het effect van de pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  als van het regulatorische cytokine IL-10 bestudeerd. Resultaten van de studie suggereerden dat pro-inflammatoire cytokines een

hierbij een rol spelen. Deze studie dient echter nog geoptimaliseerd worden om het effect van een pro-inflammatoire omgeving op de HLA-E expressie na te gaan.

Kortom, verdere studies omtrent HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen zal meer inzicht brengen in de regulatie van auto-immune responsen. Op termijn kan dit aanleiding geven tot de ontwikkeling van nieuwe en meer specifieke therapieën voor MS.

## REFERENTIES

---

1. Markovic-Plese S, McFarland HF. Immunopathogenesis of the multiple sclerosis lesion. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2001 May;1(3):257-62.
2. URL: <http://www.nationalmssociety.org>
3. Smith K.J, McDonald W.I. The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1999 Oct 29;354(1390):1649-73
4. URL: <http://www.ms-gateway.nl>
5. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res.* 2002;25:27-51
6. Bar-Or A, Oliveira E, Anderson D et al. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1999 Dec;100(1-2):252-9.
7. Kellar-Wood HF, Wood NW, Holmans P et al. Multiple sclerosis and the HLA-D region: linkage and association studies. *J Neuroimmunol.* 1995 May;58(2):183-90.
8. Oksenberg JR, Gaiser CN, Cavalli-Sforza LL et al. Polymorphic markers of human T-cell receptor alpha and beta genes. Family studies and comparison of frequencies in healthy individuals and patients with multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Hum Immunol.* 1988;22:111-121.
9. Vandevyver C, Gu XX, Geusens P et al. HLA class II and T-cell receptor beta chain polymorphisms in Belgian patients with rheumatoid arthritis: no evidence for disease association with the TCRBC2, TCRBV8 and TCRBV11 polymorphisms. *Ann Rheum Dis.* 1994 Sep;53(9):580-6.
10. Ibsen SN, Clausen J. Genetic susceptibility to multiple sclerosis may be linked to polymorphism of the myelin basic protein gene. *J Neurol Sci.* 1995 Jul;131(1):96-8.
11. Rose J, Gerken S, Lynch S et al. Genetic susceptibility in familial multiple sclerosis not linked to the myelin basic protein gene. *Lancet.* 1993 May 8;341(8854):1179-81.
12. Kahana E. Epidemiologic studies of multiple sclerosis: a review. *Biomed Pharmacother.* 2000 Mar;54(2):100-2.
13. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis: New concepts. *Brain Res Bull.* 2003 Aug 15;61(3):321-6.
14. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006 Aug;129(Pt 8):1953-71.
15. Hohlfeld R, Wekerke H. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: From pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;5:14599-606.

16. de Andrés C, Aristimuño C, de las Heras V et al. Interferon beta-1a therapy enhances CD4(+) regulatory T-cell function: An ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007 Jan;182(1-2):204
17. Hellings N, Raus J, Stinissen P. T cell based immunotherapy in multiple sclerosis: induction of regulatory immune cells by T-cell vaccination. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2006; 2(5): 705-16.
18. Hellings N, Raus J, Stinissen P. T-cell vaccination in multiple sclerosis: Update on clinical application and mode of action. *Autoimmun Rev.* 2004;3:267-75.
19. Li J, Goldstein I, Glickman-Nir E. Induction of TCR V $\beta$ -specific CD8+ CTLs by TCR V $\beta$ -derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol.* 2001 Oct 1;167(7):3800-8.
20. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T-cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T-cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* 2000 Dec;13(6):829-40.
21. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(9):1198-208.
22. Linsen L, Somers V, Stinissen P. Immunoregulation of autoimmunity by natural killer T cells. *Hum Immunol.* 2005 Dec;66(12):1193-202.
23. Lan RY, Ansari AA, Lian Z et al. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005 Jul;4(6):351-63.
24. Grigoriadis N, Grigoriadis S, Polyzoidou E et al. Neuroinflammation in multiple sclerosis: Evidence for autoimmune dysregulation, not simple autoimmune reactions. *Clin Neurol Neurosurg.* 2006 Mar;108(3):241-4.
25. Maggi E, Cosmi L, Liotta F et al. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev.* 2005 Nov;4(8):579-86.
26. Huan J, Culbertson N, Spencer L et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2005 Jul 1;81(1):45-52.
27. Zang YCQ, Hong J, Rivera VM et al. Human anti-idiotypic T cells induced by TCR peptides corresponding to a common CDR3 sequence motif in myelin basic protein-reactive T cells. *Int Immunol.* 2003 Sep;15(9):1073-80.
28. Mimran A, Mor F, Quintana FJ et al. Anti-ergotypic T cells in naïve rats. *J Autoimmun.* 2005 May;24(3):191-201.
29. Quintana FJ, Cohen IR. Anti-ergotypic immunoregulation. *Scand J Immunol.* 2006 Sep;64(3):205-10.
30. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):253-7.
31. Najafian N, Chitnis T, Salama AD et al. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest.* 2003 Oct;112(7):1037-48

32. Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8<sup>+</sup> suppressor T-cells. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(9):1218-21.
33. Kambayashi T, Kraft-Leavy JR, Dauner JG et al. The non-classical MHC class-I molecule Qa-1 forms unstable peptide complexes. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1661-9.
34. Hu D, Ikizawa K, Lu L et al. Analysis of regulatory CD8 T-cells in Qa-1 deficient mice. *Nat Immunol.* 2004 May;5(5):516-23.
35. Chess L, Jiang H. Resurrecting CD8<sup>+</sup> suppressor T cells. *Nat Immunol.* 2004 May;5(5):469-71.
36. Jiang H, Kashleva H, Xu LX et al. T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4533-7.
37. Panoutsakopoulou V, Huster KM, McCarty N et al. Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J Clin Invest.* 2004 Apr;113(8):1218-24.
38. Strong RK, Holmes MA, Li P et al. HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptides affinities, crystalstructures, and thermal stabilities. *J Biol Chem.* 2003 Feb 14;278(7):5082-90.
39. Garcia P, Llano M, de Heredia AB et al. Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol.* 2002 Apr;32(4):936-44.
40. Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P et al. HLA-E recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):10896-901.
41. Deibler GE, Martenson RE, Kies MW. Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Journal of Neuroimmunology* 1972;2:139-165.
42. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods.* 2000 Sep 21;243(1-2):147-54.
43. Ben-Nun A, Liblau RS, Cohen L et al. Restricted T-cell receptor Vβ gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis/ Predominant genes vary in individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 15;88(6):2466-70.
44. Willems E. De rol van HLA-E gerestricteerde CD8<sup>+</sup> T-cellen in multiple sclerose. Thesis.
45. Browne SK, Roesser JR, Zhu SZ et al. Differential IFN-γ stimulation of HLA-A gene expression through CRM-1-dependent nuclear RNA export. *J Immunol.* 2006 Dec 15;177(12):8612-9.

46. Gustafson KS, Ginder GD. Interferon- $\gamma$  induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1 $\alpha$  to a distinct interferon- $\gamma$ -responsive element. *J Biol Chem.* 1996 Aug 16;271(33):20035-46.
47. Pfizenmaier K, Scheurich P, Schlüter C et al. Tumor necrosis factor enhances HLA-A,B,C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. *J Immunol.* 1987 Feb 1;138(3):975-80.
48. Sospedra M, Roland M. Immunology of multiple sclerosis, *J Immunol.* 2005;23:683-747
49. Lecoer H, Fevrier M, Garcia S et al. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 2001;253:177-87



## Auteursrechterlijke overeenkomst

*Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).*

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**De rol van HLA-E gerestricteerde CD8+ T-cellen in Multiple Sclerose.**

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

**Tania Pazola**

Datum: **19.06.2007**